



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : C07K 14/47, C12N 15/12, 15/63, C07K 16/18, A61K 38/17, G01N 33/00		A1	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 99/11663</b> (43) Date de publication internationale: 11 mars 1999 (11.03.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/01864 (22) Date de dépôt international: 28 août 1998 (28.08.98)		(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(30) Données relatives à la priorité: 97/10823 29 août 1997 (29.08.97) FR		Publiée Avec rapport de recherche internationale.	
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): GENSET [FR/FR]; 24, rue Royale, F-75008 Paris (FR).			
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BOUGUELERET, Lydie [FR/FR]; 108, avenue Victor Hugo, F-92170 Vanves (FR). CHUMAKOV, Ilya [FR/FR]; 196, rue des Chèvrefeuilles, F-77000 Vaux-le-Pénil (FR).			
(74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Régimeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).			

(54) Title: HUMAN DEFENSIN DEF-X, GENE AND DNAc, COMPOSITION CONTAINING SAME AND DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC APPLICATIONS.

(54) Titre: DEFENSINE HUMAINE DEF-X, GENE ET cDNA, COMPOSITION LES CONTENANT ET APPLICATIONS AU DIAGNOSTIC ET A LA THERAPIE

(57) Abstract

The invention concerns a novel human polypeptide defensin, homologous of HNP-4, its genomic DNA and DNAc, vectors, cells transformed by said vectors, the use of said polypeptide as antibiotic, cytotoxic, repairing and endocrine regulating agent or as pesticide as well as cosmetic or pharmaceutical compositions for treating microbial infections, in particular bacterial, fungal, and viral, or parasitic, cancers, inflammation and immunodeficiency. The invention also concerns diagnostic methods and kits for determining a microbial or parasitic infection and an inflammation, or for detecting predisposition to immunodeficiency or cancerous diseases.

(57) Abrégé

La présente invention concerne une nouvelle défensine polypeptidique humaine Def-X, homologue de l'HNP-4, son ADN génomique et ADNc, des vecteurs, des cellules transformées par lesdits vecteurs, l'utilisation dudit polypeptide comme agent antibiotique, cytotoxique, de réparation et de régulation endocrine ou comme pesticide ainsi que des compositions cosmétiques ou pharmaceutiques pour le traitement des infections microbiennes, notamment bactériennes, fongiques, et virales, ou parasitaires, de cancers, de l'inflammation et de déficit immunitaire. L'invention concerne également des méthodes et des kits de diagnostic pour la détermination d'une infection microbienne ou parasitaire et d'une inflammation, ou pour le dépistage de prédisposition à des déficiences immunitaires ou des maladies cancéreuses.

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

## DEFENSINE HUMAINE DEF-X, GENE ET cDNA, COMPOSITION LES CONTENANT ET APPLICATIONS AU DIAGNOSTIC ET A LA THERAPIE

La présente invention concerne une nouvelle défensine polypeptidique humaine Dcf-X, homologue de l'HNIP-4, son ADN génomique et ADNc.

L'invention concerne également des vecteurs de clonage et d'expression, des cellules transformées par lesdits vecteurs. L'invention a aussi pour objet l'utilisation desdits polypeptides comme agent antibiotique, cytotoxique, de réparation et de régulation endocrine ou comme pesticide ainsi que des compositions cosmétiques ou pharmaceutiques pour le traitement des infections microbiennes, notamment bactériennes, fongiques, et virales, ou parasitaires, de cancers, de l'inflammation et de déficit immunitaire. Enfin, l'invention comprend des méthodes et des kits de diagnostic pour la détermination d'une infection microbienne ou parasitaire et d'une inflammation, ou pour le dépistage de prédisposition à des déficiences immunitaires ou des maladies cancéreuses.

Les substances antimicrobiennes sont des éléments primordiaux de la défense des organismes multicellulaires. Parmi ces substances, on trouve aussi bien des composés inorganiques simples (péroxide d'hydrogène, acide hypochloreux, oxyde nitrique) que des peptides et protéines complexes. Ils sont présents sur les premières lignes de défense, à la surface des muqueuses de différents organes, notamment dans les cellules épithéliales de l'intestin et des poumons, selon les espèces, ainsi que dans les organelles microbicides des cellules phagocytaires d'origine hématopoïétique où ils furent tout d'abord mis en évidence. Leur synthèse *de novo* ou leur libération à partir de sites de stockage - organelles de type lysosomes, granules cytoplasmiques, capables de les stocker sous une forme inactive ou latente - peuvent être induites rapidement, ce qui les rend particulièrement importants dans les phases précoce de résistance aux infections (Martin et al., 1995).

Les protéines antimicrobiennes d'une taille inférieure à cent acides aminés sont arbitrairement appelées peptides antimicrobiens. Plusieurs familles de peptides antimicrobiens ont été identifiées, qui diffèrent quant à la présence en leur sein de ponts disulfures, quant à leur composition en acides aminés, à leur conformation structurelle et à leur spectre d'activité. Les peptides antimicrobiens comportant six cystéines conservées forment la famille des défensines. Cette famille est composée de peptides antimicrobiens présents dans de nombreuses espèces, abondants, d'environ 3-4 kDa (Ganz et Lehrer, 1994). Ces peptides sont formés de 30 à 40 acides aminés, dont six

cystéines invariantes qui forment trois liens disulfides intramoléculaires. Ils ont une conformation complexe, sont amphipathiques, riches en feuillets bêta anti-parallèles, mais dépourvus d'hélices alpha (Lehrer et Ganz, 1992). L'action antimicrobienne des défensines résulterait de leur insertion dans les membranes des cellules cibles, permettant la formation de canaux voltage-dépendants. White et al. (1995) décrivent les mécanismes possibles d'insertion membranaire et de formation de pores multimériques par les défensines, qui permettent la perméabilisation des membranes des cellules cibles, par exemple des cellules microbiennes ou tumorales. La structure cristallographique de la défensine humaine de neutrophile HNP-3 (voir ci-dessous) a été déterminée, et un mécanisme particulier de dimérisation des défensines humaines de neutrophile est en outre suggéré. La connaissance élargie de cette famille de peptides et la comparaison de leurs séquences et spectres d'activité permettront de mieux comprendre ces mécanismes et leurs spécificités, ainsi que les résidus acides aminés plus particulièrement impliqués dans ces phénomènes.

15 Les défensines se répartissent en trois familles de peptides, structurellement différents : les défensines "classiques", les bêta-défensines et les défensines des insectes. Ces familles présentent des différences concernant la position et l'espacement des résidus cystéines conservés, ainsi que ceux d'autres acides aminés conservés (proline, glycine) (Ganz et Lehrer, 1995).

20 Les défensines humaines, de type classique, proviennent essentiellement de deux sources. Elles ont d'abord été identifiées par purification peptidique à partir d'extraits de neutrophiles. Quatre défensines ont ainsi été isolées: "human neutrophil peptides" HNP-1, HNP-2, HNP-3, et HNP-4. Les trois premières sont des produits différents du même gène (Ganz et Lehrer, 1995). Ces trois peptides représentent 99 % 25 du contenu des neutrophiles en défensines, alors que HNP-4 y est aussi présent, mais à des concentrations 100 fois plus faibles. Plus récemment, deux défensines entériques humaines, HD-5 et HD-6, ont été caractérisées dans l'intestin grêle et plus précisément dans les cellules de Paneth (Bevins et al., 1996). Alors que 16 gènes de défensines entériques ont été mis en évidence chez la souris, seuls ces deux homologues ont été 30 identifiés chez l'homme (Mallow et al., 1996).

35 Les défensines ont une action antimicrobienne sur un large spectre de microorganismes *in vitro* (Martin et al., 1995). Ce spectre d'action, particulièrement large, comprend des bactéries, Gram-positives et Gram-négatives, plusieurs champignons, des mycobactéries, des parasites dont les spirochètes et plusieurs virus à enveloppe dont les virus HSV et HIV. Elles sont également cytotoxiques pour plusieurs

catégories de cellules normales et malignes, dont les cellules résistantes au TNF-alpha et au facteur cytolytique NK (Kagan et al., 1994). La grande quantité de cibles des défensines et leur abondance dans les cellules sanguines spécialisées dans la défense immunitaire, ainsi que l'augmentation dramatique de leur concentration au cours 5 d'infections sévères, suggèrent que ces molécules joueraient un rôle important dans l'immunité naturelle aux infections et aux cancers. Notamment, l'augmentation de la transcription des gènes des défensines et la libération de granules cytoplasmiques contenant des défensines pré-synthétisées en réponse à des stimuli, contribuent à la réponse antimicrobienne locale, les défensines pouvant participer à la réaction 10 d'inflammation, aux processus de réparation et à la régulation endocrine pendant l'infection. Les défensines hématopoïétiques pourraient contribuer au phénomène de lyse des cellules cancéreuses, phénomène médié par les neutrophiles au cours de la réponse immunitaire anticorps-dépendante. Le rôle physiologique précis des défensines entériques n'est pas clairement établi. Elles pourraient endiguer la prolifération de la 15 flore intraluminale ou empêcher la translocation de bactéries à travers la muqueuse intestinale (Mallow et al., 1996). L'abondance de l'ARNm de défensine dans les cellules de Paneth renforce l'hypothèse que ces cellules épithéliales joueraient un rôle clé dans la défense immunitaire de l'intestin. Il a par ailleurs été montré que leur schéma d'expression coïncide avec l'apparition des cellules de Paneth au cours de 20 l'embryogenèse. Mallow et al. (1996) ont suggéré que de faibles taux d'expression de défensines entériques chez le foetus serait le témoin d'une immaturité de la défense locale, ce qui prédisposerait les enfants nés prématurément à des infections dues aux microorganismes intestinaux.

Une concentration des défensines correspondant à 10 % du taux normal est 25 constatée chez des patients atteints de "specific granule deficiency", une maladie rare du développement des granulocytes. Les sujets atteints souffrent d'infections fréquentes, provoquées par des bactéries communes (Ganz et Lehrer, 1995).

Les défensines modifiées biochimiquement sont de potentiels agents prophylactiques et thérapeutiques contre les infections (Ganz et Lehrer, 1995). La 30 recherche concernant ces peptides antimicrobiens ou d'autres molécules participant de l'immunité naturelle, acquiert une importance particulière depuis que se développent des phénomènes de résistance des microorganismes aux antibiotiques traditionnels (Bevins et al., 1996).

La structure primaire de défensines, notamment des défensines humaines, a 35 fait l'objet d'études récentes (White et al., 1995 ; Mallow et al., 1996). Les défensines

classiques comprennent 29 à 35 acides aminés, mais dérivent de précurseurs - préproprotéines - comprenant 90 à 100 acides aminés. La maturation protéolytique des défensines humaines de neutrophiles en peptides matures est couplée avec leur adressage vers les granulocytes ; la fonction du propeptide inclurait l'inactivation de la forme précurseur de la défensine et un support à l'acquisition de la conformation active du peptide mature (Martin et al., 1995). Les homologies peptidiques sont maximales au niveau des signaux peptides, et minimales au niveau des peptides matures, qui comportent néanmoins six résidus cystéines totalement conservés. Si la conservation de ces résidus semble nécessaire à l'acquisition de structures secondaires impliquées dans l'activité des défensines, les différences de séquences existant au sein de la très large famille de ces peptides antimicrobiens, notamment à leur extrémité N-terminale, mais aussi dans d'autres régions non conservées, semblent être des déterminants importants de leur spectre d'activité, et de leur efficacité antimicrobienne ou cytotoxique. L'identification de nouveaux membres de cette famille de peptides, et notamment de défensines humaines, est donc nécessaire à la compréhension de leur mécanisme d'action et de leur spécificité, ainsi qu'à leur utilisation comme agents anti-infectieux et/ou cytotoxiques, ou au dessin de peptides variants présentant des spectres spécifiques et/ou d'efficacité diminuée ou augmentée.

Sparkes et al. (1989), ont localisé le gène codant pour HNP-1 sur le chromosome 8, dans la région 8p23. Bevins et al. (1995), et Mallow et al. (1996), ont localisé les deux gènes codant pour HD-5 et HD-6 sur le chromosome 8, plus précisément dans la région 8p21-pter, région incluant la région précédemment identifiée comme portant les défensines hématopoïétiques. Les gènes codant pour les défensines entériques humaines HD-5 et HD-6 contiennent deux exons, alors que ceux codant pour les défensines hématopoïétiques en contiennent trois, les deux derniers exons codant pour le prépropeptide, aussi bien chez l'homme, que chez le cobaye et le lapin (Mallow et al., 1996). La comparaison des séquences génomiques des gènes HD-5 et HD-6 a révélé une très forte similarité des séquences flanquantes non codantes en 5', suggérant que celles-ci contiennent l'information nécessaire à la tissu-spécificité de l'expression de ces gènes; ces mêmes régions portent en outre de nombreux sites de fixation pour des facteurs de transcription, dont deux sites AP2 et six sites IL6, suggérant des voies de régulation de l'expression de ces gènes au cours des processus inflammatoires. De façon plus générale, le très important degré de similarité des séquences et de l'organisation génomique des défensines HNP-1, 2, 3, 4 et HD-5 et 6, a conduit Bevins et al. (1995) à

un modèle d'évolution tentant de relater l'organisation chromosomique de la famille, et les fractions homologues de chaque paire de gènes.

Il est enfin intéressant de noter que la région chromosomique 8p23 est impliquée dans de nombreuses pathologies, notamment cancéreuses : on citera par exemple le carcinome hépatocellulaire (Becker et al., 1996), le cancer du poumon non à petites cellules (Sundaresan et Augustus, 1996), le cancer de la prostate (Ichikawa et al., 1996), et le carcinome colorectal (Yaremko et al., 1994). Bien que ceci n'ait jamais été documenté, il est possible qu'une déficience en l'une ou l'autre des défensines humaines ait un rôle dans la prédisposition à de telles pathologies, ou dans leur développement.

La présente invention concerne une nouvelle défensine humaine, Def-X, homologue de la défensine HNP-4.

La présente invention a donc pour objet un polypeptide isolé choisi parmi les polypeptides suivants :

- 15 a) polypeptide dont la séquence d'acides aminés est la séquence SEQ ID N° 3 ;
- b) polypeptide homologue, variant, ou modifié du polypeptide dont la séquence d'acides aminés est la séquence SEQ ID N° 3 ;
- c) polypeptide dont la séquence d'acides aminés est la séquence d'acides aminés d'un fragment biologiquement actif d'un polypeptide tel que défini en a) ou b) ;
- 20 d) polypeptide comprenant au moins un fragment tel que défini en c).

Dans la présente description, on entendra désigner également par « polypeptide » une protéine ou un peptide.

Selon un mode préféré, le polypeptide selon l'invention est caractérisé en ce qu'il est constitué de l'un au moins des fragments suivants :

- 25 a) peptide signal dont la séquence d'acides aminés est la séquence SEQ ID N° 4, correspondant à la séquence comprise entre la position 1 et la position 19, extrémités comprises, de la séquence d'acides aminés SEQ ID N° 3 ;
- b) région pro dont la séquence d'acides aminés est la séquence SEQ ID N° 5, correspondant à la séquence comprise entre la position 20 et la position 63, extrémités incluses, de la séquence d'acides aminés SEQ ID N° 3 ;
- 30 c) peptide mature dont la séquence d'acides aminés est la séquence SEQ ID N° 6, correspondant à la séquence comprise entre la position 64 et la position 94, extrémités incluses, de la séquence d'acides aminés SEQ ID N° 3 ; ou
- d) fragment homologue, variant ou modifié d'un peptide selon a), b) ou c).

De façon encore préférée, les polypeptides selon la présente invention correspondent à la structure primaire de la défensine mature définie précédemment, c'est-à-dire la structure correspondant à la séquences d'acides aminés SEQ ID N° 6 suivante :

5 Ile Cys His Cys Arg Val Leu Tyr Cys Ile Phe Gly Glu His Leu Gly Gly Thr Cys  
Phe Ile Leu Gly Glu Arg Tyr Pro Ile Cys Cys Tyr

ses homologues, variants ou formes modifiées ainsi que leurs fragments biologiquement actifs et les polypeptides les contenant.

Il est bien entendu que les polypeptides de l'invention sont sous forme non naturelle, c'est-à-dire qu'ils ne sont pas pris dans leur environnement naturel mais qu'ils ont pu être obtenus par purification à partir de sources naturelles ou bien obtenus par recombinaison génétique ou par synthèse chimique comme cela sera décrit ci-après.

Par « polypeptide homologue », on entend un polypeptide dont la séquence d'acides aminés présente au minimum 80 %, et préférentiellement 90 %, d'acides aminés en commun.

Par « polypeptide variant », on entend désigner un polypeptide muté ou correspondant à un polymorphisme pouvant exister, notamment chez l'être humain et pouvant présenter une troncature, une substitution, une délétion et/ou une addition d'au moins un acide aminé comparé au polypeptide selon l'invention.

Par « polypeptide modifié », on entend désigner un polypeptide obtenu par recombinaison génétique ou par synthèse chimique comme cela sera décrit ci-après, présentant une modification par rapport à la séquence normale. Ces modifications pourront notamment porter sur les domaines pré-, pro- ou mature du polypeptide selon l'invention, sur les acides aminés à l'origine d'une spécificité de spectre ou d'efficacité de l'activité, ou à l'origine de la conformation structurale, de la charge, ou de l'hydrophobicité, et de la capacité de multimérisation et d'insertion membranaire du polypeptide selon l'invention. On pourra ainsi créer des polypeptides d'activité équivalente, augmentée ou diminuée, et de spécificité équivalente, plus étroite, ou plus large. Les modifications pourront aussi porter sur les séquences impliquées dans la maturation, le transport et l'adressage du polypeptide.

Par « fragment biologiquement actif » d'un polypeptide selon l'invention, on entend désigner un fragment polypeptidique ayant conservé au moins une activité du polypeptide dont il est issu, en particulier :

- capable d'être reconnu par un anticorps spécifique d'un polypeptide selon l'invention ; et/ou

- capable d'agir comme antibiotique ; et/ou
- capable d'agir comme agent cytotoxique ; et/ou
- capable d'agir comme agent antitumoral ; et/ou
- capable de moduler la réparation de tissu, la régulation endocrine ou le processus d'inflammation, notamment durant une infection

5 Selon l'invention, les fragments biologiquement actifs de polypeptides selon l'invention auront au minimum 10 acides aminés, de préférence 15 acides aminés.

10 Comme cela a été indiqué précédemment, parmi les fragments biologiquement actifs, un fragment préféré est le peptide mature de séquence d'acides aminés SEQ ID N° 6.

Parmi les homologues du peptide mature, il faut citer les polypeptides dans lesquels jusqu'à 5 acides aminés ont été modifiés, tronqués à l'extrémité N- ou C-terminale, ou bien déletés, ou bien ajoutés, ce qui représente environ 80 % de la séquence.

15 Les fragments biologiquement actifs de ce peptide mature comportent de préférence de 10 à 15 acides aminés, dont l'intérêt pourra être de pouvoir être obtenus facilement par synthèse chimique.

Comme cela est indiqué, les modifications du polypeptide mature auront pour objectif notamment de :

- moduler l'activité de la défensine,
- modifier sa spécificité, tant au niveau des microorganismes sur lesquels elle est active que sur sa localisation tissulaire,
- modifier sa biodisponibilité.

25 Les composés précédents peuvent être obtenus en utilisant la chimie combinatoire, dans laquelle il est possible de faire varier systématiquement des parties de polypeptide avant de les tester sur des modèles, cultures cellulaires ou des microorganismes par exemple, pour sélectionner les composés les plus actifs ou présentant les propriétés recherchées.

La synthèse chimique présente également l'avantage de pouvoir utiliser :

- des acides aminés non naturels, ou
- des liaisons non peptidiques.

Ainsi, afin d'améliorer la durée de vie des peptides, il pourra être intéressant d'utiliser des acides aminés non naturels, par exemple sous forme D, ou bien des analogues d'acides aminés, notamment des formes soufrées par exemple.

Enfin, la structure de la défensine mature ou de ses homologues, variants ou modifiés, de même que les fragments correspondant, pourront être intégrés dans des structures chimiques de type polypeptidique ou autres. Ainsi, il pourra être intéressant de prévoir aux extrémités N- et C-terminales des composés non reconnus par les protéases.

5 L'invention comprend également les acides nucléiques codant pour un polypeptide selon l'invention.

Selon un mode préféré, les acides nucléiques selon l'invention seront choisis parmi les acides nucléiques suivants :

- a) acide nucléique de séquence SEQ ID N° 1 (génomique) ;
- 10 b) acide nucléique de séquence SEQ ID N° 2 (cDNA) ;
- c) acide nucléique équivalent, homologue, muté ou modifié, par rapport aux acides nucléiques selon a) ou b) ;
- d) fragment des séquences a), b) ou c) ayant au moins dix bases ;
- 15 e) acide nucléique capable de s'hybrider avec l'une des séquences telles que définies en a), b), c) ou d).

Il est entendu que la présente invention ne concerne pas les séquences génomiques dans leur environnement chromosomique naturel ; il s'agit de séquences qui ont été isolées, c'est-à-dire qu'elles ont été prélevées directement ou indirectement, leur environnement ayant été au moins partiellement modifié.

20 Il peut ainsi s'agir d'ADN génomique, d'ADNc, ou d'ARN, comportant ou non des nucléotides non naturels ; il peut s'agir d'acides nucléiques naturels isolés, ou d'acides nucléiques de synthèse.

25 Par acide nucléique équivalent, on entendra un acide nucléique codant pour les polypeptides selon l'invention, compte tenu de la dégénérescence du code génétique, et les ADNc et ARN correspondants.

Par acide nucléique homologue, on entendra un acide nucléique dont la séquence présente une homologie d'au moins 80 %, de préférence 90 %, avec les séquences nucléiques selon l'invention.

30 Par acide nucléique muté, on entendra tout acide nucléique codant pour un polypeptide variant selon l'invention, et tout acide nucléique comportant, par rapport aux séquences SEQ ID N° 1 et SEQ ID N° 2, au moins une mutation dans les séquences promotrices et/ou régulatrices, lesquelles pourront avoir un effet sur l'expression du polypeptide notamment sur son taux d'expression et la tissu-spécificité de celle-ci. Les séquences présentant un polymorphisme présent chez l'être humain sont donc incluses 35 dans l'invention. Parmi ces polymorphismes, certains pourront conduire à des

déficiences immunitaires, de réponse aux infections, à des prédispositions et/ou au développement de cancers.

Par acide nucléique modifié, on entendra tout acide nucléique codant pour un polypeptide modifié selon l'invention, ou tout acide nucléique obtenu par mutagenèse 5 selon des techniques bien connues de l'homme de l'art, et comportant des modifications par rapport aux séquences normales, notamment des mutations dans les séquences régulatrices et/ou promotrices, notamment conduisant à une modification du taux et/ou de la tissu-spécificité de l'expression du polypeptide.

La présente invention concerne l'ensemble des amorces et sondes, qui 10 pourront être marquées selon des méthodes bien connues de l'homme du métier, permettant de mettre en évidence, notamment par des techniques basées sur l'hybridation ou sur l'amplification, par exemple par PCR, les séquences nucléiques selon l'invention, y compris de discriminer les séquences normales des séquences mutées.

15 Parmi les fragments d'acides nucléiques intéressants, il faut citer en particulier les oligonucléotides anti-sens, c'est-à-dire dont la structure assure, par hybridation avec la séquence cible, une inhibition de l'expression du produit correspondant. Il faut encore citer les oligonucléotides sens qui, par interaction avec des protéines impliquées dans la régulation de l'expression du produit correspondant, 20 induiront soit une inhibition, soit une activation de cette expression.

Il pourra s'agir de séquences qui agissent aussi bien au niveau des séquences exoniques ou introniques décrites que sur les séquences flanquantes, notamment les promoteurs et/ou régions 5' UTR.

La présente invention concerne également des vecteurs de clonage ou 25 d'expression comportant une séquence nucléotidique telle que décrite précédemment.

Ces vecteurs de clonage ou d'expression pourront comporter des éléments assurant l'expression de la séquence dans une cellule hôte, notamment des séquences promotrices et des séquences de régulation efficaces dans ladite cellule.

Le vecteur en cause pouvant être à réplication autonome ou bien destiné à 30 assurer l'intégration de la séquence au sein des chromosomes de la cellule hôte.

Dans le cas de systèmes à réplication autonome, en fonction de la cellule hôte, procaryote ou eucaryote, on utilisera de préférence des systèmes de type plasmidique ou des systèmes viraux, les virus vecteurs pouvant être notamment des adénovirus (Perricaudet et al., 1992), des rétrovirus, des poxvirus ou des virus

herpétiques (Epstein et al., 1992). L'homme de métier connaît les technologies utilisables pour chacun de ces virus.

Ainsi, il est connu d'utiliser comme vecteur viral des virus défectifs dont la culture est effectuée dans des cellules de complémentation, ceci évitant les risques éventuels de prolifération d'un vecteur viral infectieux.

Lorsque l'on souhaitera l'intégration de la séquence dans les chromosomes de la cellule hôte, il sera nécessaire de prévoir de part et d'autre de la séquence nucléotidique à intégrer une ou plusieurs séquences provenant de la cellule hôte afin d'assurer la recombinaison. Il s'agit là également de procédés qui sont largement décrits dans la technique antérieure. On pourra, par exemple, utiliser des systèmes de type plasmidique ou viral ; de tels virus seront, par exemple, les rétrovirus (Temin, 1986) ou les AAV, Adenovirus Associated Virus (Carter, 1993).

L'invention concerne également les cellules procaryotes ou eucaryotes transformées par un vecteur tel que décrit précédemment et ceci afin d'assurer l'expression d'une défensine Def-X naturelle, normale ou variante, ou modifiée; ou bien, par exemple, d'un de ses fragments.

Comme cela a été indiqué précédemment, la présente invention concerne également les polypeptides obtenus par culture des cellules ainsi transformées et récupération de la protéine exprimée, ladite récupération pouvant être effectuée de façon intracellulaire ou bien de façon extracellulaire dans le milieu de culture lorsque le vecteur a été conçu pour assurer la sécrétion de la protéine par le biais, par exemple, d'une séquence "signal", le polypeptide étant sous forme d'un pré-polypeptide ou prépro-polypeptide. Les constructions permettant la sécrétion des polypeptides sont connues, aussi bien pour des systèmes procaryotes que des systèmes eucaryotes. Dans le cadre de la présente invention, certains des polypeptides Def-X pourront comporter leur propre système de sécrétion ou d'insertion membranaire.

Il est bien entendu que les polypeptides recombinants selon l'invention peuvent être obtenus sous forme glycosylée ou non glycosylée et présenter ou non la structure tertiaire naturelle.

Parmi les cellules utilisables pour la production de ces polypeptides, il faut citer bien entendu les cellules bactériennes (Olins et Lee, 1993), mais également les cellules de levure (Buckholz, 1993), de même que les cellules animales, en particulier les cultures de cellules de mammifère (Edwards et Aruffo, 1993) mais également les cellules d'insectes dans lesquelles on peut utiliser des procédés mettant en oeuvre des baculovirus par exemple (Luckow, 1993).

Les cellules ainsi obtenues peuvent permettre de préparer des polypeptides naturels, variants ou modifiés, Des-X, mais également des fragments de ces polypeptides, notamment des polypeptides pouvant correspondre aux fragments biologiquement actifs.

5 La présente invention concerne, en outre, les mêmes polypeptides selon l'invention mais obtenus par synthèse chimique et pouvant comporter des acides aminés non naturels ou modifiés.

10 Les polypeptides selon la présente invention, en particulier la défensine mature, de même que les homologues, dérivés ou polypeptides matures modifiés, peuvent être obtenus par synthèse chimique et ce en utilisant l'une quelconque des nombreuses synthèses peptidiques connues, par exemple les techniques mettant en œuvre des phases solides ou des techniques utilisant des phases solides partielles, par condensation de fragments ou par une synthèse en solution classique.

15 Lorsque les composés selon la présente invention sont synthétisés par la méthode en phase solide, l'acide aminé C-terminal est fixé sur un support solide inerte et comporte des groupes protecteurs de son groupement amino en alpha (et si cela est nécessaire, des protections sur ses groupes fonctionnels latéraux).

20 A la fin de cette étape, le groupe protecteur du groupement amino terminal est éliminé et on fixe le second acide aminé comportant lui aussi les protections nécessaires.

Les groupes protecteurs N-terminaux sont éliminés après que chaque acide aminé a été fixé, par contre on maintient, bien entendu, la protection sur les chaînes latérales.

25 Lorsque la chaîne polypeptidique est complète, on clive le peptide de son support et on élimine les groupes de protection latéraux.

La technique de synthèse en phase solide est décrite notamment dans Stewart et al. (1984) et Bodanszky (1984).

30 Il ne sera pas ici évoqué les détails de la synthèse, il convient simplement de rappeler que les groupes protecteurs préférés pour les groupements alpha-amino sont des groupes protecteurs de type uréthane (BOC ou FMOC). Quant aux réactifs de couplage, ils sont très nombreux, parmi eux il faut bien entendu citer plus particulièrement la N,N'-diisopropyl-carbodiimide (DIC) mise en œuvre en général dans le DMF ou le DCM.

35 Lorsque l'on souhaitera utiliser des amino-acides non naturels, il pourra être nécessaire de prévoir d'autres types de réactif et en particulier d'autres types de système de protection.

La présente invention concerne également les anticorps polyclonaux ou monoclonaux obtenus par réaction immunologique d'un organisme humain ou animal avec un agent immunogène constitué par un polypeptide selon l'invention, notamment un polypeptide obtenu par culture d'une des cellules précédemment décrites, ou par synthèse chimique comme indiqué précédemment.

5 L'invention s'étend donc aux anticorps monoclonaux et polyclonaux ou un de leurs fragments, anticorps chimériques, capables de reconnaître spécifiquement un polypeptide selon l'invention.

10 L'invention comprend aussi les anticorps selon l'invention, caractérisés en ce qu'ils sont marqués.

15 Les anticorps marqués pourront être, par exemple, immunoconjugués à des enzymes telles que la peroxydase ou la phosphatase alcaline, ou marqués à l'aide de composés fluorescents, de la biotine ou encore radiomarqués. Les techniques de marquage sont bien connues de l'homme du métier et ne seront pas développées dans la 20 présente description.

L'invention s'étend également à l'utilisation d'un polypeptide selon l'invention comme agent antimicrobien, notamment antibactérien, antifongique, antiviral et/ou antiparasitaire, comme agent cytotoxique, à visée notamment anticancéreuse, et/ou comme agent de modulation des processus d'inflammation, de réparation tissulaire et de 25 régulation endocrine, notamment corticostatique.

Selon un autre aspect, l'invention concerne une composition pharmaceutique comprenant un polypeptide selon l'invention, pouvant être associée à un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Une telle composition pourra être administrée par voie systémique, locale ou 30 topique.

Son mode d'administration, sa posologie, ses formes galéniques optimales pourront être déterminés selon les critères généralement pris en compte dans l'établissement d'un traitement adapté à un patient, notamment son âge, son poids corporel, la tolérance de traitement, ses effets secondaires constatés, etc..

35 L'invention comprend également une composition pharmaceutique comprenant un vecteur selon l'invention capable d'exprimer *in vivo* un polypeptide selon l'invention, pouvant être associé à un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Il est également possible de prévoir l'expression de polypeptides ou leurs fragments *in vivo*, notamment par le biais de la thérapie génique et en utilisant les 35 vecteurs qui ont été décrits précédemment.

Dans le cadre de la thérapie génique, il est possible également de prévoir l'utilisation des séquences des gènes ou des ADNc précédemment décrits, "nus", cette technique a notamment été développée par la société Vical, qui a montré qu'il était, dans ces conditions, possible d'exprimer le polypeptide dans certains tissus sans avoir recours 5 au support d'un vecteur viral notamment.

Toujours dans le cadre de la thérapie génique, il est également possible de prévoir l'utilisation de cellules transformées ex-vivo, lesquelles pourront être ensuite réimplantées, soit telles quelles, soit au sein de systèmes de type organoïde, tel que cela est également connu dans l'état de la technique (Danos et al. 1993). On peut également 10 envisager l'utilisation d'agents facilitant le ciblage d'un type cellulaire déterminé, la pénétration dans les cellules ou le transport vers le noyau.

Lesdites compositions pharmaceutiques sont, selon l'invention, destinées à la prévention et/ou au traitement des infections microbiennes, notamment les infections microbiennes d'origines bactériennes, de bactéries Gram-positives ou Gram-négatives, 15 mycobactériennes, fongiques et virales, ou parasites, notamment de spirochètes.

Selon un mode préféré, l'invention concerne avantageusement les compositions pharmaceutiques selon l'invention caractérisées en ce que les infections virales sont des infections liées à des virus à enveloppe, notamment les virus HSV et HIV.

20 L'invention a également pour objet des compositions pharmaceutiques selon l'invention, destinées à la prévention et/ou au traitement des cancers, notamment les mélanomes, le cancer du foie, de la prostate, du poumon non à petites cellules ou le carcinome colorectal.

25 L'invention comprend, en outre, des compositions pharmaceutiques selon l'invention, destinées à augmenter les défenses immunitaires, à augmenter les défenses immunitaires en cas d'immunodéficience acquise ou à prévenir l'immunodéficience, notamment pour le traitement du psoriasis, ou à moduler les processus inflammatoires dans les cas notamment de maladies à inflammation chronique.

30 Les polypeptides selon la présente invention sont plus particulièrement utilisables sous forme topique externe, par exemple sur la peau et les muqueuses. Ces formes topiques externes peuvent être aussi bien à usage pharmaceutique, dermatologique qu'à usage cosmétique.

En particulier, ces compositions peuvent être utilisées comme agent antiseptique pharmaceutique ou bien comme antiseptique dans certains cosmétiques, soit

pour assurer un nettoyage de la peau ou des phanères et/ou à titre de conservateur des compositions.

Les compositions topiques selon la présente invention peuvent être utilisées notamment dans certaines affections cutanées, oculaires, vaginales ou buccales. Elles 5 peuvent également être utilisées comme agent cosmétique additionnel, notamment dans certains shampoings traitants.

L'invention concerne également la mise en évidence de l'absence ou d'une quantité anormale de protéine ou d'acide nucléique correspondant à la défensine X comme marqueur d'une infection ou de pathologies qui seront décrites ci-après.

10 L'invention concerne également la mise en évidence d'une forme anormale de la protéine ou la présence d'un acide nucléique anormal correspondant à une défensine mutée qui peut éventuellement être totalement inactive. Dans ce cas, la présence de cette forme anormale peut être un marqueur de prédisposition à certaines affections, notamment l'immunodéficiency et/ou des cancers.

15 C'est pourquoi, la présente invention concerne une méthode de diagnostic d'une immunodéficiency et/ou d'une prédisposition à certains types de cancers, caractérisée en ce qu'on met en évidence dans un prélèvement de patient la présence d'une défensine anormale et/ou d'une séquence codant pour une défensine anormale.

20 Les méthodes de diagnostic selon la présente invention permettent, notamment, la mise en évidence d'une immunodéficiency, et/ou d'une prédisposition à un ou des cancers, notamment ceux cités précédemment, en particulier dans des familles à risque. Ce type de diagnostic sera en général effectué par mise en évidence des formes mutées de la protéine ou des séquences d'acide nucléique.

25 Mais l'invention concerne également des méthodes de diagnostic de l'inflammation, d'immunodéficiency, de prédisposition à des affections de type cancer et/ou d'infections dues à des microorganismes ou liées à un déficit immunitaire ou phénomène inflammatoire, caractérisées en ce qu'elles comprennent le dosage d'un polypeptide ou d'un acide nucléique selon l'invention dans un échantillon biologique et la comparaison du résultat dudit dosage obtenu avec la quantité de polypeptide ou 30 d'acide nucléique présente normalement dans un échantillon biologique équivalent.

Dans ce cas, le dosage peptidique permettra, en général, une détection d'une infection microbienne ou parasitaire et/ou d'une inflammation. Les dosages péptidiques peuvent être réalisés par tout procédé connu, ELISA ou RIA par exemple. La mise en évidence d'une forme anormale de la défensine-X peut être réalisée, par exemple, à

l'aide d'un anticorps monoclonal spécifique de cette forme, en particulier les anticorps objet de l'invention.

Selon un mode de réalisation préféré, l'invention comprend avantageusement les méthodes caractérisées en ce qu'elles mettent en œuvre une sonde et/ou une amorce oligonucléotidique selon l'invention.

On préférera en général les méthodes dans lesquelles tout ou partie de la séquence correspondant au polypeptide Def-X est amplifiée préalablement par dosage d'acide nucléique selon l'invention, ces méthodes d'amplification pouvant être réalisées par des méthodes dites PCR ou PCR-like. Par PCR-like on entendra désigner toutes les méthodes mettant en œuvre des reproductions directes ou indirectes des séquences d'acides nucléiques, ou bien dans lesquelles les systèmes de marquage ont été amplifiés, ces techniques sont bien entendu connues, en général il s'agit de l'amplification de l'ADN par une polymérase ; lorsque l'échantillon d'origine est un ARN il convient préalablement d'effectuer une transcription réverse. Il existe actuellement de très nombreux procédés permettant cette amplification, par exemple les méthodes dites NASBA "Nucleic Acid Sequence Based Amplification" (Compton 1991), TAS "Transcription based Amplification System" (Guatelli et al. 1990), LCR "Ligase Chain Reaction" (Landegren et al 1988), "Endo Run Amplification" (ERA), "Cycling Probe Reaction" (CPR), et SDA "Strand Displacement Amplification" (Walker et al. 1992), bien connues de l'homme du métier.

L'invention concerne en outre des kits ou nécessaires de diagnostic pour la détermination d'une infection microbienne ou parasitaire, d'une inflammation, d'une immunodéficience et/ou d'une prédisposition à des affections de type cancer, caractérisés en ce qu'ils comprennent un anticorps selon l'invention.

Les kits ou nécessaires de diagnostic pour la détermination d'une infection microbienne ou parasitaire, d'une inflammation, d'une immunodéficience et/ou de prédisposition à des affections de type cancer, caractérisés en ce qu'ils comprennent une sonde et/ou une amorce selon l'invention font également partie de l'invention.

L'invention a, enfin, pour objet l'utilisation de polypeptide selon l'invention comme pesticide, notamment pour la culture de végétaux d'intérêt industriel comme, par exemple, les plantes vivrières telles que le maïs, le blé, le soja, le riz ou le colza, les plantes fourragères, les arbres fruitiers, la vigne ou les plantes ornementales.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples ci-après, illustrés par les figures dont les légendes sont décrites ci-dessous.

Légendes des figuresFigure 1

Séquence génomique de hDef-X.

Est présentée la totalité de la séquence d'ADN génomique de hDef-X qui présente une 5 homologie significative avec le gène codant pour hDef-4 (HNP-4).

La séquence présente les sites suivants, dont la présence est déduite par homologie avec la séquence hDef-4 :

• CAAT box	1711-1714
• TATA box	1758-1767
10 • mRNA start	1836
• exon 1	1836-1874
• site d'épissage 1	GTCAGT
• insertion Alu	2155-2335
• insertion fragment de L1	2710-2780
15 • site d'épissage 2	CAG
• exon 2	3394-3577
• début de phase codante	3406
• site d'épissage 3	GTGAGA
• site d'épissage 4	CAG
20 • exon 3	4164-4379
• fin de phase codante	4276
• site de polyadénylation	4374-4379.

Figure 2

Alignement des séquences génomiques des défensines humaines Def-X et Def-4 (HNP- 25 4).

Alignement de la totalité de la séquence d'ADN génomique de la nouvelle défensine Def-X présentant une homologie avec l'ADN génomique de hDef-4 (GenBank accession number U18745).

Les annotations présentent les positions sur la séquence de hDef-4 des signaux CAAT 30 box, TATA box, sites d'épissage, débuts et fins d'introns/d'exons, début de transcription, site de polyadénylation.

Figure 3

Alignement des séquences d'ADNc de hDef-4 (HNP-4) et hDef-X.

Les séquences présentent une homologie globale de 61,4 %. L'alignement révèle une 35 insertion d'environ 75 bases en aval du codon STOP, présentes sur la séquence de hDef-

4, mais non sur celle de hDef-X ; l'homologie forte reprend sur toute la région comprise entre l'extrémité de cette insertion et celle de l'ADNc. En dehors de cette région d'insertion, le degré d'homologie entre séquences nucléiques est donc remarquable.

Figure 4

5 Séquence peptidique de la protéine hDef-X.

La position des sites de clivage du signal peptide et de la région pro ont été déduites de l'alignement des séquences peptidiques de hDef-4 et hDef-X.

Figure 5

10 Alignement des séquences peptidiques des défensines humaines connues hDef-1, hDef-4, hDef-5, et hDef-6 avec hDef-X.

- \* L'étoile indique un acide aminé conservé sur les cinq séquences.
- Le point indique un acide aminé dont la classe est conservée sur les cinq séquences (acide aminé soit identique, soit faisant l'objet d'une substitution conservative).
- ^ six flèches indiquent les positions des six cystéines conservées au travers de la classe des défensines classiques et responsables de la structure tridimensionnelle nécessaire à l'activité de ces peptides.

EXEMPLES

20 Exemple 1 : Identification du gène codant pour hDef-X

Isolement du BAC B0725B12

Afin d'analyser la région 8p23 du génome humain, notamment dans la région connue comme portant des gènes codant pour des défensines humaines, on a isolé un BAC ("Bacterial Artificial Chromosome") correspondant à ladite région. Une banque 25 de BACs couvrant le génome humain complet a été préparée à partir de l'ADN d'une lignée lymphoblastique humaine dérivée de l'individu n° 8445 des familles du CEPH. Cette lignée a été utilisée comme source d'ADN de haut poids moléculaire. L'ADN a été partiellement digéré par l'enzyme de restriction BamH1, puis cloné au site BamH1 du plasmide pBeloBacII. Les clones ainsi obtenus ont été "poolés" et criblés selon une 30 procédure d'analyse tridimensionnelle précédemment décrite pour le criblage des banques de YACs ("Yeast Artificial Chromosome") (Chumakov et al., 1992 et 1995). Les pools tridimensionnels obtenus ont été criblés par PCR à l'aide des amorces encadrant le marqueur SHGC-10793, pour Neutrophil defensin 4 precursor (GeneBank : numéro d'accession U18745) ; un clone du BAC B0725 B12 a été ainsi isolé.

Après digestion par l'enzyme de restriction NotI, la taille de l'insert porté par ce BAC a été déterminée sur un gel d'agarose 0,8 % après migration par électrophorèse en champ alterné (CHEF) (4 heures à 9Volts/cm, avec un angle de 100°, à 11°C en tampon 0,5 x TAE). On a ainsi mis en évidence que le BAC B0725B12 porte un insert de 220 kb, avec un site interne pour l'enzyme NotI.

Localisation chromosomique du BAC B0725B12 par hybridation in situ fluorescente (FISH)

La localisation chromosomique du BAC dans la région candidate 8p23.1-23.2 a été confirmée par hybridation in situ fluorescente (FISH) sur chromosomes métaphasiques, selon la méthode décrite par Cherif et al., (1990).

Séquençage de l'insert du BAC B0725B12

Afin de séquencer l'insert du BAC B0725B12, on a préparé une banque de sous-clones à partir de l'ADN soniqué de ce BAC.

Les cellules issues d'un litre de culture "overnight" ont été traitées par lyse alcaline selon les techniques classiques. Après centrifugation du produit obtenu dans un gradient de chlorure de césum, 12 µg d'ADN du BAC B0725B12 ont été purifiés. 3 µg d'ADN ont été soniqués afin d'obtenir des fragments dont les tailles se distribuent uniformément de 1,2 kb à 1,5 kb. Les fragments obtenus ont été traités dans un volume de 50 µl avec 2 unités de Vent polymérase pendant 20 minutes à 70°C, en présence des 4 déoxytriphosphates (100 µM). Les fragments aux extrémités franches résultant de cette étape ont été séparés par électrophorèse en gel 1 % d'agarose à bas point de fusion (60 Volts pendant 3 heures). Les fragments groupés selon leurs tailles ont été excisés et les bandes obtenues traitées par l'agarose. Après extraction au chloroforme et dialyse sur colonnes Microcon 100, l'ADN en solution a été ajusté à une concentration de 100 ng/µl.

Une ligation a été effectuée "overnight" en mettant en présence 100 ng de l'ADN fragmenté du BAC B0725B12 et 20 ng d'ADN du vecteur BluescriptSK linéarisé par digestion enzymatique, et traité par la phosphatase alcaline. Cette réaction a été réalisée dans un volume final de 10 µl en présence de 40 unités/µl de T4 ADN ligase (New England Biolabs). Les produits de ligation ont ensuite servi à transformer par électroporation, soit une souche XL-Blue (pour les plasmides multicopies), soit une souche D10HB (pour les sous-clones issus du BAC). Les clones lacZ<sup>-</sup> résistant à l'antibiotique ont été repiqués individuellement en microplaques pour stockage et séquençage.

On a ainsi obtenu 960 sous-clones correspondant à l'insertion de fragments de 1,2 kb à 1,5 kb au site BarnHI (rendu franc) du plasmide BluescriptSK.

Les inserts de ces sous-clones ont été amplifiés par PCR sur cultures bactériennes conduites "overnight", en utilisant les amorces des vecteurs flanquant les insertions. La séquence des extrémités de ces inserts (en moyenne 500 bases de chaque côté) a été déterminée par séquençage automatique fluorescent sur séquenceur ABI 377, 5 équipé du logiciel ABI Prism DNA Sequencing Analysis (version 2.1.2).

Les fragments de séquence provenant des sous-BACs ont été assemblés par le logiciel Gap4 de R. Staden (Bonfield et al., 1995). Ce logiciel permet la reconstruction d'une séquence complète à partir de fragments de séquences. La séquence déduite de l'alignement des différents fragments est la séquence consensus.

10 On a enfin utilisé des techniques de séquençage dirigé (marche systématique de l'amorce) pour parfaire les séquences et relier les contigs.

#### Analyse des séquences pour l'identification de gènes

15 Les exons potentiels de l'insert du BAC B0725B12 ont été repérés par recherche d'homologie sur les banques publiques de protéines, d'acides nucléiques et d'EST (Expressed Sequence Tags).

#### *Banques de données*

On a utilisé des ressources locales des principales banques publiques. La 20 banque de protéines utilisées est constituée par la fusion non redondante des banques Genpept (traduction automatique de GenBank, NCBI ; Benson et al., 1996) ; Swissprot (George et al., 1996) et PIR/NBRF (Bairoch et al., 1996). Les doublons ont été éliminés par le logiciel "nrdb" (domaine public, NCBI ; Benson et al., 1996). Les répétitions internes ont ensuite été masquées par le logiciel "xnu" (domaine public, NCBI ; Benson et al., 1996). La banque résultante, dénommée NRPU (Non-Redundant Protein-Unique) 25 a servi de référence pour les recherches d'homologies protéiques. Les homologies trouvées avec cette banque ont permis de localiser des régions codant potentiellement pour un fragment de protéine au moins apparenté à une protéine connue (exons codants). La banque d'EST utilisée est composée des sous-sections "gbest" (1-9) de Genbank (NCBI ; Benson et al., 1996). Elle contient tous les fragments de transcrits publics.

30 Les homologies trouvées avec cette banque ont permis de localiser des régions potentiellement transcrtes (présentes sur l'ARN messager).

La banque d'acides nucléiques (autres que les EST) utilisée contient toutes autres sous-sections de Genbank et de l'EMBL (Rodriguez-Tome et al., 1996) dont les doublons ont été éliminés comme précédemment.

*Logiciels*

On a utilisé l'ensemble de logiciels BLAST (Altschul et al., 1990) de recherche d'homologies entre une séquence et des banques de données protéiques ou nucléiques. Les seuils de signification utilisés dépendent de la longueur et de la 5 complexité de la région testée ainsi que de la taille de la banque de référence. Ils ont été ajustés et adaptés à chaque analyse.

Exemple 2 : analyse des séquences nucléiques et peptidiques de hDef-XStructure du gène codant pour hDef-X

10 L'alignement du gène codant pour hDef-X avec ceux codant pour les défensines connues a permis de noter une homologie maximale entre hDef-X et hDef-4 (Figure 2). Le taux global d'homologie des deux séquences nucléiques est de 72 %. Les deux seules régions de l'ADN génomique de hDef-X ne présentant pas d'homologie avec celui de hDef-4 correspondent à deux zones d'insertion de séquence répétée dans la 15 séquence de hDef-X, qui sont absentes sur la séquence de hDef-4 : un élément de type Alu (positions 2155 à 2335) et un fragment d'élément de Line 1 (positions 2710 à 2780).

On note une conservation importante de la région flanquant en 5' la région promotrice, d'où découle probablement une conservation importante des éléments de régulation de la stabilité du messager et de l'expression du gène.

20 La forte conservation de la séquence de l'exon 1, non traduit, permet de rattacher définitivement la défensine hDef-X à la classe des défensines classiques hématopoïétiques, soit hDef-1, 2, 3 et 4, par opposition aux défensines entériques hDef-5 et 6, dont la séquence génomique ne comporte que deux exons, tous deux codants.

25 L'alignement des ADNc de hDef-4 et hDef-X, indiquant une homologie supérieure à 60 %, est présenté Figure 3.

Analvse protéique

La séquence peptidique de la défensine selon l'invention est représentée Figure 4. Les trois domaines de la protéine sont positionnés comme suit :

30

- peptide signal : aa 1-19
- région pro : aa 20-63
- peptide mature : aa 64-94.

Les degrés d'homologies spécifiques entre hDef-4 et hDef-X ont été calculés, selon la région de la protéine concernée :

- peptide signal : 63,2 %

- région pro : 52,3 %
- peptide mature : 37,9 %.

5 L'homologie globale est de 49,5 %. Ces chiffres confirment la très forte homologie qui existe entre défensines, homologie maximale au niveau des peptides signaux et minimale au niveau des peptides matures.

On retrouve dans la séquence protéique primaire de Def-X les acides aminés conservés dans la classe des défensines classiques, notamment les six cystéines impliquées dans la structure tridimensionnelle de celles-ci (Figure 5).

Afin de prédire les structures secondaires présentes sur la défensine selon 10 l'invention, on a utilisé les logiciels de prédiction de structure secondaire inclus dans le Protein Interpretation Package, Copyright MRC 1994, Medical Research Council, Hillsroad, Cambridge, United Kingdom.

15 Ces logiciels ont notamment permis de comparer les structures prédites de Def-X et HNP-4. Profils d'hydrophobicité, structures en alpha-hélices, feuillets  $\beta$ , amphiphilicité sont superposables dans les deux peptides, ce qui suggère des processus analogues d'insertion membranaire et de formation de canaux ioniques multimériques pour ces deux défensines.

#### Exemple 3 : Recherche de mutations associées à des cas familiaux de cancers

##### Extraction de l'ADN génomique

20 L'ADN génomique de patients immunodéficients ou atteints de cancer, est extrait du sang veineux périphérique après lyse cellulaire, digestion protéique, partition organique et finalement précipitation alcoolique, selon des techniques classiques bien connues de l'homme de l'art.

25 Il est notamment intéressant d'étudier la présence de mutations dans l'ADN génomique d'individus issus de familles à fort taux cancer, tous types de cancers confondus. Une déficience dans un gène de défensine de granulocyte, tel hDef-X peut en effet avoir un rôle dans la prédisposition aux cancers, comme mentionné précédemment.

##### Amplification de l'ADN génomique

30 Des amores oligonucléotidiques sont utilisées pour l'amplification génomique des séquences exoniques dérivées du BAC B0725B12 ; elles sont prédites par analyse informatique, et définies à l'aide du logiciel OSP (Hillier et al., 1991).

35 Toutes ces amores contiennent, en amont des bases spécifiquement ciblées par l'amplification, une queue oligonucléotidique universelle commune, destinée à permettre le séquençage des fragments amplifiés (PU : 5'-

TGTAAAACGACGCCAGT-3' pour les amores en amont, et RP : 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3' pour les amores en aval).

Les amores oligonucléotidiques sont synthétisées selon la méthode des phosphoramidites, sur un synthétiseur GENSET UFPS 24.1.

5 L'amplification de chaque séquence exonique prédicta est réalisée par réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR), dans les conditions suivantes :

Volume final	50 µl
ADN génomique	100 ng
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
10 dNTP (pour chacun)	200 µM
Amorce (pour chacune)	7.5 pmoles
AmpliTaq Gold DNA polymerase (Perkin)	1 unité
Tampon de PCR (10X = 0.1 M Tris HCl pH 8.3, 0.5 M KCl)	1 X.

15 L'amplification est réalisée dans un thermocycleur Perkin Elmer 9600 ou MJ Research PTC200 avec couvercle chauffant. Après un chauffage à 94°C pendant 10 minutes, 35 cycles sont effectués. Chaque cycle comprend : 30 secondes à 94°C, 1 minute à 55°C et 30 secondes à 72°C. Un segment final d'elongation de 7 minutes à 72°C termine l'amplification.

20 La quantité de produits d'amplification obtenua est déterminée sur microplaque de 96 puits, par fluorométrie, utilisant l'agent intercalant Picogreen (Molecular Probes).

#### Détection des polymorphismes/mutations

25 Les produits de l'amplification génomique par PCR sont séquencés sur séquenceur automatique ABI 377, en utilisant des amores fluorescentes marquées par les fluorochromes ABI (Joc, Fam, Rox et Tamra) et l'ADN polymérase Thermosequanase (Amersham).

Les réactions sont réalisées en microplaques de 96 puits, sur thermocycleur Perkin Elmer 9600, dans des conditions classiques de cycles de température :

- 8 cycles : dénaturation : 5 sec. à 94°C ; hybridation : 10 sec. ; elongation : 30 sec. à 72°C, puis
- 13 cycles : dénaturation : 5 sec. à 94°C ; elongation : 30 sec. à 72°C.

6 unités de Thermosequanase, et 5-25 ng de produit d'amplification sont utilisés par réaction de séquence.

35 A l'issue des cycles d'amplification, les produits des réactions de séquence sont précipités dans l'éthanol, resuspendus dans du tampon de charge contenant de la

formamide, dénaturés, et déposés sur gels d'acrylamide 4 % ; les électrophoreses (2 heures 30 à 3 000 Volts) sont conduites sur séquenceurs ABI 377 équipés des logiciels ABI de collection et d'analyse (ABI Prism DNA Sequencing Analysis Software, version 2.1.2.).

5 Les séquences obtenues chez des patients atteints des déficiences étudiées, notamment chez des patients issus de familles à forte prédisposition aux cancers, sont comparées aux séquences obtenues chez des sujets contrôles, apparentés et non apparentés. Une analyse statistique (calcul de lod score) permet de conclure quant à la 10 signification de la présence d'un site d'hétérozygotie et à son association avec une prédisposition aux cancers.

#### Exemple 4 : Recherche de mutations ponctuelles

Les mutations ponctuelles identifiées comme indiqué ci-dessus, peuvent ensuite être mises en évidence chez des sujets présentant une potentielle déficience dans 15 le gène codant pour hDef-X, selon de nombreuses méthodes connues de l'homme de l'art. Parmi celles-ci, on peut citer la liste non exhaustive suivante :

- séquençage
- « single nucleotide primer extension » (Sylvanen et al., 1990)
- RFLP
- 20 • recherche de « single strand conformation polymorphism »
- méthodes basées sur un clivage des régions misappariées (clivage enzymatique par la S1 nucléase, clivage chimique par différents composés tels que la pipéridine ou le tétroxide d'osmium)
- mise en évidence d'hétéroduplex en électrophorèse
- 25 • méthodes basées sur l'utilisation d'« allele specific oligonucleotide » (ASO, Stoneking et al., 1991)
- méthode OLA (« dual color oligonucleotide ligation assay, Samiotaki et al., 1994)
- méthode ARMS (« amplification refractory mutation system »), ou ASA (« allele specific amplification »), ou PASA (« PCR amplification of specific allele ») (Wu et 30 al., 1989).

REFERENCES

Altschul, Stephen F., Gish W., Miller W., Myers E. W., & Lipman D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-10 (1990).

5 Bairoch A. & Apweiler R. The SWISS-PROT protein sequence data bank and its new supplement TREMBL. *Nucleic Acids Res.* 24: 21-25 (1996).

10 Becker S.A., Zou, Y.Z. & Slagle, B.L. Frequent loss of chromosome 8p in hepatitis B virus-positive hepatocellular carcinomas from China. *Cancer Res.* 56 (21) : 5092-7 (1996).

15 Benson D. A., Boguski M., Lipman D. J. & Ostell J. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 24: 1-5 (1996).

Bodansky M., Principles of peptide synthesis, (1984).

20 Bevins, C.L., Jones, D.E., Dutra, A., Schaffzin, J. & Muenke, M. Human enteric defensin genes : chromosomal map position and a model for possible evolutionary relationships. *Genomics* 31 : 95-106 (1996).

Bonfield J. K., Smith K. F. & Staden R. A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Res.* 23 : 4992-9 (1995).

25 Buckholz R.G. Yeast Systems for the Expression of Heterologous Gene Products. *Curr. Op. Biotechnology* 4: 538-542 (1993).

Carter B.J. Adeno-Associated virus vectors. *Curr. Op. Biotechnology* 3: 533-539 (1993).

30 Cherif D., Julier C., Delattre O., Derré J., Lathrop G.M., & Berger R. : Simultaneous localization of cosmids and chromosome R-banding by fluorescence microscopy - Applications to regional mapping of chromosome 11. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* 87 : 6639-6643 (1990).

Chumakov I., Rigault P., Guillou S., Ougen P., Billaut A., Guasconi G., Gervy P., Le Gall I., Soularue P., Grinas P. et al. Continuum of overlapping clones spanning the entire human chromosome 21q. *Nature* 359: 380-386 (1992).

5 Chumakov I.M., Rignault P., Le Gall I. et al. A YAC contig map of the human genome. *Nature* 377 suppl : 175-183 (1995).

Compton J. Nucleic Acid Sequence-Based Amplification. *Nature* 350: 91-92 (1991).

10 Danos O., Moullier P. & Heard J.M. Réimplantation de cellules génétiquement modifiées dans des néo-organes vascularisés. *Médecine/Sciences* 9:62-64 (1993).

Edwards C.P. et Aruffo A. Current applications of COS cell based transient expression systems. *Curr. Op. Biotechnology* 4: 558-563 (1993).

15 Epstein A. : Les vecteurs herpétiques pour le transfert de gènes - *Médecine/Sciences* 8: 902-911 (1992).

Ganz T. & Lehrer R.I. Defensins. *Curr. Op. Immunology*. 6 : 584-9 (1994).

20 Ganz T. & Lehrer R.I. Defensins. *Pharmac. Ther.* Vol. 66 : 191-205 (1995).

George D. G., Barker W. C., Mcwes H. W, Pfeiffer F. & Tsugita A. The PIR-International Protein Sequence Database. *Nucleic Acids Res.* 24: 17-20 (1996).

25 Guatelli J.C. et al. Isothermal in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1874-1878 (1990).

30 Hillier L. & Green P. OSP : a computer program for choosing PCR and DNA sequencing primers. *PCR Methods Appl.* 1: 124-8 (1991).

Ichikawa, T., Nihei, N., Kuramochi, H., Kawana, Y., Killary, A.M.; Rinker-Schaeffer, C.W., Barrett, J.C., Isaacs, J.T., Kugoh, H., Oshimura, M. & Shimazaki, J. Metastasis 35 suppressor genes for prostate cancer. *Prostate Suppl.* 6 : 31-35 (1996).

Kagan, B.L., Ganz, T. & Lehrer, R.I. Defensins: a family of antimicrobial and cytotoxic peptides. *Toxicology* 87: 131-149 (1994).

Landegren U., Kaiser R., Sanders J. & Hood L.A. Ligase-mediated gene detection  
5 technique. *Science* 241: 1077-1080 (1988).

Lehrer & Ganz. Defensins: endogenous antibiotic peptides from human leukocytes. *Ciba Found. Symp.* 171: 276-290 (1992).

10 Luckow V.A. Baculovirus systems for the expression of human gene products. *Curr. Op. Biotechnology* 4: 564-572 (1993).

15 Mallow, E.B., Harris, A., Salzman, N., Russel, J.P., DeBerardinis, R.J., Ruchelli, E., & Bevins, C.L. Human enteric defensins. Gene structure and developmental expression. *J. Biol. Chem.* 271 (8): 4038-4045 (1996).

Martin, E., Ganz, T. & Lehrer, R.I. Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates. *J. Leukocyte Biol.* 58: 128-136 (1995).

20 Olins P.O. et Lee S.C. Recent advances in heterologous gene expression in *E. coli*. *Curr. Op. Biotechnology* 4: 520-525 (1993).

25 Perricaudet M., Stratford-Perricaudet L., & Briand P. : La thérapie génique par adénovirus - *La Recherche* 23: 471-473 (1992).

Rodriguez-Tome P., Stoehr P. J., Cameron G. N., & Flores T. P. The European Bioinformatics Institute (EBI) databases. *Nucleic Acids Res.* 24: 6-12 (1996).

30 Samiotaki M., Kwiatkowski M., Parik J., & Landegren U. Dual-color detection of DNA sequence variants through ligase-mediated analysis. *Genomics* 20: 238-242 (1994).

35 Sparkes, R.S., Kronenberg, M., Heinzmann, C., Daher, K.A., Klisak, I., Ganz, T. & Mohandas, T. Assignment of defensin gene(s) to human chromosome 8p23. *Genomics* 5 (2): 240-4 (1989).

Stewart, J.M. et Yound, J.D. Solid Phase Peptides Synthesis. Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 2ème éd., (1984).

Stoneking M., Hedgecock D., Higuchi R.G., Vigilant L., & Erlich H.A. Population variation of human DNA control region sequences by enzymatic amplification and sequence-specific oligonucleotide probes. Am. J. Hum. Genet. 48: 370-382 (1991).

Sundaresan, T.S. & Augustus, M. Cytogenetics of non-small cell lung cancer : simple technique for obtaining high quality chromosomes by fine needle aspirate cultures. 10 Cancer Genet. Cytogenet. 91 (1) : 53-60 (1996).

Syvänen A.C., Aalto-Setala K., Harju L., Kontula K. & Soderlund H. A primer-guided nucleotide incorporation assay in the genotyping of Apo E. Genomics 8 : 684-692 (1990).

15 Temin H.M. : Retrovirus vectors for gene transfer. In Kucherlapati R., ed. Gene Transfer, New York, Plenum Press, 149-187 (1986).

Walker G.T., Fraiser M.S., Schram J.L., Little M.C., Nadeau J.G., & Malinowski D.P. 20 Strand displacement amplification : an isothermal in vitro DNA amplification technique. Nucleic Acids Res. 20: 1691-1696 (1992).

White, S.H., Wimley, W.C. & Selsted, M.E. Structure, function, and membrane integration of defensins. Curr. Op. Structural Biology. 5 : 521-527 (1995).

25 Wu D.Y., Uguzzoli L., Pal B.K. & Wallace R.B. Allele-specific amplification of b-globin genomic DNA for diagnosis of sickle cell anemia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 2757-2760 (1989).

30 Yaremko, M.L., Waslylyshyn, M.L., Paulus, K.L., Michelassi, F. & Westbrook, C.A. Deletion mapping reveals two regions of chromosome 8 allele loss in colorectal carcinomas. Genes Chromosomes Cancer. 10 (1) : 1-6 (1994).

REVENDICATIONS

1) Polypeptidé isolé choisi parmi les polypeptides suivants :

- a) polypeptide dont la séquence d'acides aminés est la séquence SEQ ID N° 3 ;
- 5 b) polypeptide homologue, variant ou modifié du polypeptide dont la séquence d'acides aminés est la séquence SEQ ID N° 3 ;
- c) polypeptide dont la séquence d'acides aminés est la séquence d'acides aminés d'un fragment biologiquement actif d'un polypeptide tel que défini en a) ou b) ;
- d) polypeptide comprenant au moins un fragment tel que défini en c).

10 2) Polypeptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est constitué de l'un au moins des fragments suivants :

- a) peptide signal dont la séquence d'acides aminés est la séquence SEQ ID N° 4 ;
- b) région pro dont la séquence d'acides aminés est la séquence SEQ ID N° 5 ;
- c) peptide mature dont la séquence d'acides aminés est la séquence SEQ ID N° 6 ; ou
- 15 d) fragment homologue, variant ou modifié d'un peptide selon a), b) ou c).

3) Polypeptidé dont la séquence d'acides aminés est la séquence SEQ ID N° 6, ses homologues, variants ou formes modifiées ainsi que leurs fragments biologiquement actifs et les polypeptides les contenant.

4) Acide nucléique codant pour un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 3.

5) Acide nucléique choisi parmi les acides nucléiques suivants :

- a) acide nucléique de séquence SEQ ID N° 1 ;
- b) acide nucléique de séquence SEQ ID N° 2 ;
- c) acide nucléique équivalent, homologue, muté ou modifié, par rapport aux acides nucléiques selon a) ou b) ;
- 25 d) fragment des séquences a), b) ou c) ayant au moins dix bases ;
- e) acide nucléique capable de s'hybrider avec l'une des séquences telles que définies en a), b), c) ou d).

6) Vecteur de clonage ou d'expression dans une cellule hôte appropriée d'une séquence nucléotidique, caractérisé en ce qu'il comporte une séquence selon l'une des revendications 4 et 5.

7) Vecteur selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il comporte les éléments assurant l'expression de ladite séquence dans ladite cellule hôte.

8) Cellule transformée par un vecteur selon l'une des revendications 6 et 7.

9) Cellule selon la revendication 8, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule procaryote.

10) Cellule selon la revendication 8, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule eucaryote.

5 11) Procédé de production d'un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'on cultive une cellule selon l'une des revendications 8 à 10 et en ce que l'on récupère le polypeptide produit.

12) Polypeptide susceptible d'être obtenu par la mise en œuvre du procédé selon la revendication 11.

10 13) Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il est obtenu par synthèse chimique.

14) Anticorps monoclonal ou polyclonal ou un de leurs fragments, anticorps chimériques, caractérisé en ce qu'il est capable de reconnaître spécifiquement un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 3, 12 et 13.

15 15) Anticorps selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il est marqué.

16) Sonde ou amorce oligonucléotidique, caractérisée en ce qu'elle est constituée d'un acide nucléique selon l'une des revendications 4 et 5.

17) Sonde selon la revendication 16, caractérisée en ce qu'elle est marquée.

18) Utilisation d'un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 3, 12 et 20 13 comme agent antimicrobien et/ou antiparasitaire.

19) Utilisation d'un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 3, 12 et 13 comme agent cytotoxique, notamment à visée anticancéreuse.

20 25 21) Utilisation d'un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 3, 12 et 13 comme agent de modulation des processus de l'inflammation, de réparation tissulaire et de régulation endocrine, notamment corticostatique.

22) Composition pour usage topique externe, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 3, 12 et 13.

23) Composition selon la revendication 21, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une composition cosmétique.

30 24) Composition pharmaceutique comprenant un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 3 et 12 et 13.

25) Composition pharmaceutique comprenant un vecteur selon l'une des revendications 6 et 7, capable d'exprimer *in vivo* un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 3.

25) Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 21, 23 et 24, caractérisée en ce qu'elle comprend un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

26) Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 21, 23 à 25, destinée à la prévention et/ou au traitement des infections microbiennes ou parasitaires.

5 27) Composition pharmaceutique selon la revendication 26, caractérisée en ce que les infections microbiennes ou parasitaires sont des infections d'origines bactériennes, de bactéries Gram-positives ou Gram-négatives, mycobactériennes, fongiques, ou liées à des spirochètes.

10 28) Composition pharmaceutique selon la revendication 26, caractérisée en ce que les infections virales sont des infections liées à des virus à enveloppe, notamment les virus HSV et HIV.

29) Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 21, 23 à 25, destinée à la prévention et/ou au traitement de cancers, notamment les mélanomes.

15 30) Composition pharmaceutique selon la revendication 29, caractérisée en ce que le cancer est le cancer du foie, de la prostate, du poumon non à petites cellules ou le carcinome colorectal.

20 31) Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 21, 23 à 25, destinée à augmenter les défenses immunitaires, à augmenter les défenses immunitaires en cas d'immunodéficience acquise ou à prévenir l'immunodéficience, notamment pour le traitement du psoriasis.

32) Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 21, 23 à 25, destinée à moduler les processus inflammatoires, notamment dans les cas de maladies à inflammation chronique.

25 33) Méthode de diagnostic d'une immunodéficience et/ou d'une prédisposition à des affections de type cancer, caractérisée en ce qu'on met en évidence dans un prélèvement de patient la présence d'une défensine anormale et/ou d'une séquence codant pour une défensine anormale.

30 34) Méthode de diagnostic d'infections dues à des microorganismes ou liés à un déficit immunitaire ou à un phénomène inflammatoire, caractérisée en ce qu'elle comprend le dosage d'un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 3 ou d'un acide nucléique selon l'une des revendications 4 et 5 dans un échantillon biologique et la comparaison du résultat dudit dosage obtenu avec la quantité dudit polypeptide, respectivement dudit acide nucléique, présente normalement dans un échantillon biologique équivalent.

35) Méthode de diagnostic d'inflammation, d'une immunodéficience et/ou d'une prédisposition à des affections de type cancer, caractérisée en ce qu'elle comprend le dosage d'un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 3 ou d'un acide nucléique selon l'une des revendications 4 et 5 dans un échantillon biologique et la comparaison du résultat dudit dosage obtenu avec la quantité dudit polypeptide, respectivement dudit acide nucléique, présente normalement dans un échantillon biologique équivalent.

36) Méthode de diagnostic selon l'une des revendications 33 à 35, caractérisée en ce qu'elle met en œuvre un anticorps selon l'une des revendications 14 et 15.

37) Méthode de diagnostic selon l'une des revendications 33 à 35, caractérisée en ce qu'elle met en œuvre une sonde et/ou une amorce oligonucléotidique selon l'une des revendications 16 et 17.

38) Kit ou nécessaire de diagnostic pour la détermination d'une infection microbienne ou parasitaire, d'une inflammation, d'une immunodéficience et/ou de prédisposition à des affections de type cancer, caractérisé en ce qu'il comprend un anticorps selon l'une des revendications 14 et 15.

39) Kit ou nécessaire de diagnostic pour la détermination d'une infection microbienne ou parasitaire, d'une inflammation, d'une immunodéficience et/ou de prédisposition à des affections de type cancer, caractérisé en ce qu'il comprend une sonde et/ou une amorce selon l'une des revendications 16 et 17.

40) Utilisation d'un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 3, 12 et 13, comme pesticide, notamment pour la culture de végétaux d'intérêt industriel.

1/16

ACACCATTG TCTTCATGTA ACCCCATTAG CTATACCCCTC TAGTGCAAGG AAACCATAAGG  
 10 20 30 40 50 60

CCCTAGGTCA CACCATGAGG CTGCNCTTAC AAGTTATGCA AAAACTATGG ACTTGGGAGA  
 70 80 90 100 110 120

CCTGTGCGTA ACAACATCAC ACNCCAAATT TAACCAGCTC TCCCCATAAC ACCACGCTCA  
 130 140 150 160 170 180

TGTGTTACTG AGGAATAAGCC TGTGGATTGG AGTGTGTTCT GTGTGCAGGA GGCTGGTCCA  
 190 200 210 220 230 240

GGTTTCACTT CTGCAGGACA CTGGACGTTT CCCAAACCA GCAGACTTTC CCCACGTGCA  
 250 260 270 280 290 300

CACACACCCC TTCTCATTTC GCCTCTACAT CCATATCCAC TGGGCCCTTC AGGCACCTAC  
 310 320 330 340 350 360

TAATGCCCTA GAACCTAAAA CCATCATCTG GGGCCCAGTT CCCTGAATGG CCCTAACTCTC  
 370 380 390 400 410 420

TTCCTCTGCT GGAATGAGTC CAGTGCCAC TTCCCTCCAAC GGTGAAATTG CTGGGCTGCT  
 430 440 450 460 470 480

ACAGATCAGG AACTCACTGC TTCCCTCATAG GGGCAGCCGA CTTCACTGCT CTGCAACAGC  
 490 500 510 520 530 540

GACCACCCCT AGCGAGGCTT GAGATGCCTC TTGCCTCCTT AAGACTGAGG GAGACGCTTC  
 550 560 570 580 590 600

AGCTCTCACT CCACTGCCCA AAGTCCTCCA CAGCGCGGTG CCTGCTGCCT TCACACAGAG  
 610 620 630 640 650 660

CTGCAGGGGN AGGTCTGTG TATCCGGCCT GCTGGACCAG CGCTGTGCAC AACCCCTCCA  
 670 680 690 700 710 720

TGGCAACAGT GGCTGCCCGG CCTGCACACT GGGCTTGGCA ACCTCGCTGT AGGTATTTAT  
 730 740 750 760 770 780

TCCCTCAGGA GTGACTGCAT TCTTTCCCA TTTCCAGAAA ACTGATGCCA TTTACCTCAC  
 790 800 810 820 830 840

TATGAGGAGG AGGAGGGAGGA GGAGGGTGGA GAGTGGTACA TTTAAAATG TGCACTATTC  
 850 860 870 880 890 900

TCCCTAGGAC TCCCCCTCAA ATAACCCAGG AGGGACCATA CCAGCTCATT CCTGTGTATC  
 910 920 930 940 950 960

CCAAGCATAN GAGTAATCAT CCCACTCATG CTGAGTGTAT GGTGGCCATT AAGCCTGCC  
 970 980 990 1000 1010 1020

Figure 1

2/16

TGAACTGGCT TTAGAACAAAG GTGTTGAGC ACACAGCACC GTCTTGCTGC CACCTTGGCC  
 1030 1040 1050 1060 1070 1080

CCCTCCCTTG TGAGACCTCT GAGACACATT NAGGTCTCAC CTAAAAATCT CAGGATTCT  
 1090 1100 1110 1120 1130 1140

AGCCCCAAAN CGGTCCCTAAA AAATTTGTTCA GTCTGAACTC TCTAAGGTCA AGAGAAGAGG  
 1150 1160 1170 1180 1190 1200

TGGTTGCTCC CTCTAAGAAA CCACATGTTG CATGTACATC CTTAATTCCG GAAAGTCAA  
 1210 1220 1230 1240 1250 1260

CAAACCTGCC CTGCTTAGCA ACACAAAGCCG AGGTGGTACT CCTCTCACCC GGGCATTCTC  
 1270 1280 1290 1300 1310 1320

CAACACACCT GTTGTCCAA ACAGCTTGA TTTGTTTTTA TAGTTGGACC CCAGGTTCCC  
 1330 1340 1350 1360 1370 1380

AGGAGGCTGG TTCAGGCCAT ATTCCAAATC CTCATCTGTG TGTGAGTGGC ATTCTTAGCC  
 1390 1400 1410 1420 1430 1440

TAGCCTCCTT ACAGGGTGGG TACTATGATA CACAGCCAGG CTGTCCCAGT GGCTTTCAAT  
 1450 1460 1470 1480 1490 1500

ATTCTTTGG TCCAGATAGT TCAGCCTCAG CACCAGTGTG GGCATCACAG GGTCAATTG  
 1510 1520 1530 1540 1550 1560

CTTAGGAGTC ATGGAGAATT CATACTGGT AGCTACCTGG GCCTGCCAG GGCTGACCAT  
 1570 1580 1590 1600 1610 1620

AGACAAGGCA TCCCTCTGTG AACTCCTATT TTAATGCCAG CTTCCCAACA AATTCTCAA  
 1630 1640 1650 1660 1670 1680  
 CAAT box

CTGCTCTTAC CAGCAGGTAT TTAAACTACT CAATAGAAAG TAACCCTGAA AATTAGGACA  
 1690 1700 1710 1720 1730 1740  
 TATA box

CCTGTTCCA AAAGACCCCTT AAATAGGGGA AGTCCTTTCN CTGCTTGTC ACAGCTGCTG  
 1750 1760 1770 1780 1790 1800

| ->mRNA -----

ATGTGGCAAC ATGAGGCCTG GGACAGGGGA CTGTCCCTGT CCCACTCTGG TAGCCTCACG  
 1810 1820 1830 1840 1850 1860

Spsite

-- exon 1 ---->#####

TAGCTTAAACAT ATCTGTCACT AATACAATAC AAAACTTAAA CTTTCATACT GCGGTTCCAC  
 1870 1880 1890 1900 1910 1920

CCAGGAAGCT GTGTTCCCAA TCTGACCCGT GATTATGGGG CCACCTCAGA GGGNACCCAG  
 1930 1940 1950 1960 1970 1980

Figure 1 (suite)

3/16

TGAGGGAAATA TTTTGCCATC TGGGACTGTT GGTTGCTGGG GCCAGTGGCT ATGAGCTCAG  
 1990 2000 2010 2020 2030 2040  
 TTAATAAAGT CAAGCAGTTT CCTTCCAAAC ACACATGTCC TACCTAACGT GTCCAACAGA  
 2050 2060 2070 2080 2090 2100  
 -----  
 GATGATCATA CTCATANGCT GCTAAACAT TANTTTTATT TTGAGAAGAG TCTATTCAAG  
 2110 2120 2130 2140 2150 2160  
 ----- Alu insert -----  
 TTCTGGCCC ATGGAGTTT CATTTNATTA NTTTATTTAT TTGACAGAGA TGGAGTCTCA  
 2170 2180 2190 2200 2210 2220  
 -----  
 CTATGTTGCT CAAGCTGGTC TCCAACCTCT GGGCTCAAGC GATCTCCTA CTTTGGCCTT  
 2230 2240 2250 2260 2270 2280  
 -----  
 TGAAAGCGCT GAGATTGCCT GTGTGAGCCA TCATGGGGC TCACTGGCCC ACTGATTAAT  
 2290 2300 2310 2320 2330 2340  
 CAGATTAATT GTTTTTGCT ATTGAANTTG TTTGACTTCC TTGTATATTC GGATATTTAC  
 2350 2360 2370 2380 2390 2400  
 CCATTCTAAC ACGTAGGGTT TGCAAATATT TTCTCTCATG TTCTGTGTTG CTTTTCACT  
 2410 2420 2430 2440 2450 2460  
 CAGTTGATGG TTTCCTTGC TGTGCAGGTG CTTTAGTGT CAACGCAGCC CCGCTTGTCT  
 2470 2480 2490 2500 2510 2520  
 ATTTCCATT TTATTGCCTG TCCCTTGAT GTCATAGCCA AGAAATAATT GCCCAGATTA  
 2530 2540 2550 2560 2570 2580  
 ATGTCAAAAAA GCTTATCCC TATATATTCT TCTAGTAGTT TATGGTTCA GATCTTATGT  
 2590 2600 2610 2620 2630 2640  
 TTAGGTCTTC AATCCATTGA GTTGATTTT GTATGTGGTA TAAGAAAAAA GACCACATGT  
 2650 2660 2670 2680 2690 2700  
 ATACATATCT CAAATTCTAA GGTAGTATAT ATTAGACACA TACAATGTGT CTATTTACAC  
 2710 2720 2730 2740 2750 2760  
 ACATTGAGCT GAAAATAATA AACATATTT TATCTTCAA TCAACTCTAT CTCTATCTCA  
 2770 2780 2790 2800 2810 2820  
 CTGAACCTGT TTCACCTATA GCCTGATGAG GTTGCTGTCC TCTCTACCCC AGCTCCTATA  
 2830 2840 2850 2860 2870 2880  
 GGAGACTGCT CATCCCCCTAA CCTCAAAAAAC CCCTTCATGA GGGTGATAAT GCCCFTGAAT  
 2890 2900 2910 2920 2930 2940

Figure 1 (suite)

4/16

CCTGCAATGA ATTAGTTCTC TACTACAGTG GAAATTCAGGT CTGTTATGAG GGTCTGGATC  
 2950 2960 2970 2980 2990 3000  
  
 TCTGAAGAGA AGAGCTCTCA TTTTCAGAAA ATAAGCAGGA TTTATTCCT GAAATTAATC  
 3010 3020 3030 3040 3050 3060  
  
 AATTAATCA CTGTTTCGAT TACTTTTGC AATATTAATAA CTAAATATTAA AACAGGTAA  
 3070 3080 3090 3100 3110 3120  
  
 AACAGAAAT AATGCTAGGG TCCTTATCAT CACCGTGAAT TCCAAGCTAG CATAGACACT  
 3130 3140 3150 3160 3170 3180  
  
 AACCTAGAG ATTACACACTA GAATGAAAGC TGGGAGAGCA GAGGAGCTCTC AGAAGGATGT  
 3190 3200 3210 3220 3230 3240  
  
 GGAGGCCAAT GGACACCTGC AACCTCTCCA ACCAAATGCC TACCTCCTCT CACTGCAGCA  
 3250 3260 3270 3280 3290 3300  
  
 TCCATCTCTG AGCCTTCTCG CAGCAGAGCT ATAAATTCAG CCTGGCTCTC CCGTTCCCAC  
 3310 3320 3330 3340 3350 3360

Spsite CDS start  
####-----

ACATCCACTC CTGCTCTCCC TCCTCTCCTC CAGGTGACTA CAGTTATGAG GACCCCTCACC  
 3370 3380 3390 3400 3410 3420

----- Exon 2 -----

CTCCTCTCTG CCTTTCTCCT GGTGGCCCTT CAGGCCTGGG CAGAGCCGCT CCAGGCAAGA  
 3430 3440 3450 3460 3470 3480

GCTCATGAGA TGCCAGCCCCA GAAGCAGCCT CCAGCAGATG ACCAGGATGT GTCATTTAC  
 3490 3500 3510 3520 3530 3540

Spsite  
----->#### ####

TTTTCAGGAG ATGACAGCTG CTCTCTTCAG GTTCCAGGTG AGAGATGCCA GCATGCAGAG  
 3550 3560 3570 3580 3590 3600

CTACAGACTA GACAGAAGGA CAGGAGACAG GCTCTGGAAT TGGATCTCAG TGGCAGATGT  
 3610 3620 3630 3640 3650 3660

CACTTAGGTG GCTATACTTA ACATCTCTGG TCCTGGATTTC TCTCATATCT AAATGGAATA  
 3670 3680 3690 3700 3710 3720

GAGAACCAAA GAAATCTAAG AGATTTTCT TTCTCCAAA ACTTGATTCC AAGATATGAC  
 3730 3740 3750 3760 3770 3780

GTGAAATTC ACTAGATTAA AGATATAAGG AGATGCTACC TAGTTCCCTC TGGAGCCAGA  
 3790 3800 3810 3820 3830 3840

Figure 1 (suite)

5/16

CAAACAAAGCT TAAGTATATA GGAAAATATT TCACCCCTGTC TATATAGGAG GTTTTAGAAC  
 3850 3860 3870 3880 3890 3900 3900  
  
 CTGGAGAGGA GCCTAAGAAT GTGTTCAGGT GTGTGTGTGA TGGGCAGGAA TGCAGAAAAG  
 3910 3920 3930 3940 3950 3960  
  
 TGAAAGCAAAG GAGAATGAGT CTCGAATCCT GTGTGACCAAG CACTGCTCTG TGTATTTATT  
 3970 3980 3990 4000 4010 4020  
  
 CCTATGACT GAGATTGTTT GTGCTACCGG CTGTAATACA CCCAACATCA CTCATCAGCC  
 4030 4040 4050 4060 4070 4080  
  
 AACATGTGAC TTCTCCAAGA TTCCCTTAC CACCCACTCC TGNACCCCGT ACTCAGTTTC  
 4090 4100 4110 4120 4130 4140  
  
 Spsite  
 #####-----  
 TGATGCTCTC TCTGGGTCCC CAGGCTCAAC AAAGGGCTTG ATCTGCCATT GCAGAGTACT  
 4150 4160 4170 4180 4190 4200  
  
 ----- Exon 3 -----  
 ATACTGCATT TTTGGAGAAC ATCTGGTGG GACCTGCTTC ATCCTGGTG AACGCTACCC  
 4210 4220 4230 4240 4250 4260  
  
 CDS stop  
 \*\*\*-----  
 AATCTGCTGC TACTAAGCTT GCAGACTAGA GAAAAAGAGT TCATAATTTT CTTTGAGCAT  
 4270 4280 4290 4300 4310 4320  
  
 ----->  
 TAAAGGGAAT TGTTATTCTT ATACCTGTC CTCGATTCC TGTCCTCATC CCAAATAAAT  
 4330 4340 4350 4360 4370 4380  
  
 ACTTGGTAAC ATGATTTCCG GGTTTTTTT TTTTT  
 4390 4400 4410

Figure 1(suite)

6/16

	10	20	30	40	50	
DEF4	GGATCCCCATTTGTCTTCAGTGTAAACCC-ATTAGTTAAACCGCC-TACTGCAAGGAACCA					
DEFX	ACACCATTTGTCTTCAGTGTAAACCCATAGCTATAACCCCTAGTGCAGGAACCA	10	20	30	40	
					50	
	60	70	80	90	100	110
DEF4	CAAGGCCTGGATCAGATCATGAGGCTGCCCT-ACAAGTATGCCAAGGATATGGACTTG					
DEFX	TAGGGCCCTAGGTACACCATGAGGCTGCNCTACAAGTATGCC-AAAAGCTATGGACTTG	60	70	80	90	100
						110
	120	130	140	150	160	170
DEF4	GAAGACCTGTCTGTTATAATATCACAC-CCAAATCTAACAGCTCTGCCAATAACAGCTC					
DEFX	GGAGACCTGTGCGTAACACATCACACNCCAAATTAAACCAGCTCTCCCATAACAGCAC	120	130	140	150	160
						170
	180	190	200	210	220	230
DEF4	TCTCCTATGTTACTAGGAAAATGCCTATGGATTGGAGTGTGTTCTGTGTGCAGGAGGCTG					
DEFX	GCTCATGTGTTACTGAGGAAATGCCTGTGGATTGGAGTGTGTTCTGTGTGCAGGAGGCTG	180	190	200	210	220
						230
	240	250	260	270	280	290
DEF4	GTCCAGGTTCACTTCTGCAGGACACTGGACATC-CCCAACACCAGACCTTCCCCAC					
DEFX	GTCCAGGTTCACTTCTGCAGGACACTGGACGTTCCAAACCAAGCAGACTTCCCCAC	240	250	260	270	280
						290
	300	310	320	330	340	350
DEF4	GTGCACACACACCCCTCTCATTTGCCTCTACATCCATATCCACTGGCCCTTCAGGCA					
DEFX	GTGCACACACACCCCTCTCATTTGCCTCTACATCCATATCCACTGGCCCTTCAGGCA	300	310	320	330	340
						350
	360	370	380	390	400	410
DEF4	CCTACTAATGCCCTAGAACCTAAACCATCATCTGGGGCCCAGTCCCCAAATGCCCTA					
DEFX	CCTACTAATGCCCTAGAACCTAAACCATCATCTGGGGCCCAGTCCCCAAATGCCCTA	360	370	380	390	400
						410
	420	430	440	450	460	470
DEF4	ATTCCTTCCCTGTGGAATGAGTCCAGTGCCCACTTCCCTCAAAGGTGAAATTGCTGGG					
DEFX	ATCTCTTCCCTGTGGAATGAGTCCAGTGCCCACTTCCCTCAAACGGTGAAATTGCTGGG	420	430	440	450	460
						470
	480	490	500	510	520	530
DEF4	CCTGCAACAGATCAGGAACACTACTGCTTC-TCATAGGGGCAGCCGACTTCAGTGTCTGG					
DEFX	C-TGCTACAGATCAGGAACACTACTGCTTCCTCATAGGGGCAGCCGACTTCAGTGTCTGC	480	490	500	510	520
						530

Figure 2

7/16

DEF4	540	550	560	570	580	590
	AACAGCGACCACCCCTAGCGAGGCTTGAGATGCCTCTTCCCTCCTTAAGACTGAGAGCGC					
DEFX	540	550	560	570	580	590
	AACAGCGACCACCCCTAGCGAGGCTTGAGATGCCTCTTCCCTAAGACTGAGGGAGA					
DEF4	600	610	620	630		
	CGCT-----GCCCGAGTCCTCCATAGCCCAGTGCCTGGCTGCCCTCA					
DEFX	600	610	620	630	640	650
	CGCTTCAGCTCTCACTCCACTGCCCAAGTCCACAGCGCGGTGCCTG-CTGCCCTCA					
DEF4	640	650	660	670	680	690
	GCCAGAGCTGCAGGG-AGGCCCTGAGCACCCAAAGTCCTGCTGGACCAGCGCTGTGCACG					
DEFX	660	670	680	690	700	710
	CACAGAGCTGCAGGGNAGGTCCGTGTATCC--GGCCTGCTGGACCAGCGCTGTGCACA					
DEF4	700	710	720	730	740	750
	GCCCTCCCATGGCGGCAGGGGCTGCCTGGACTGCATACTGGGTTCAGCAACCTCACTATA					
DEFX	720	730	740	750	760	770
	ACCCCTCCCATGGCAACAGTGGCTGCCCGGCCGCACACTGGGCTTGGCAACCTCGCTGTA					
DEF4	760	770	780	790	800	810
	GGTATTCTCCCTCAGGAACAACTGCATTCTTCTCATTTCCAGAAACCTCATCCCGT					
DEFX	780	790	800	810	820	830
	GGTATTCTCCCTCAGGAGTGACTGCATTCTTCCATTTCCAGAAACTGATGCCAT					
DEF4	820	830	840	850	860	
	TTACCTCACTACAAGGAGGAGGATG-----GTGGAGAGTGGTACATTTAAATGT					
DEFX	840	850	860	870	880	890
	TTACCTCACTATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGTGGTACATTTAAATGT					
DEF4	870	880	890	900	910	920
	GCACTAGTCTCCCTGGACTCCCCTCAAATAACCCAGGAGGGACCACACAAGGGAAAGC					
DEFX	900	910	920	930	940	950
	GCACTATTCTCCCTAGGACTCCCCTCAAATAACCCAGGAGGGACCATAACAGCTCATTC					
DEF4	930	940	950	960	970	980
	TTATGCATCCCCCCCACCC-AGTGACCATCTTCCCTAACTCTGGGTGTAGGGAGACTCGTA					
DEFX	960	970	980	990	1000	1010
	CTGTGTATCCCAAGCATANGAGTAATCATCCCACATGCTGAGTGTATGGTGGCCATTA					
DEF4	990	1000	1010	1020	1030	1040
	AGCCTACG--GGATTGGTTGGAACAGGGTATTGAGCTCACAAACACAAAGGTGATGCAA					
DEFX	1020	1030	1040	1050	1060	
	AGCCTGCCCTGAACGGCTTAAAGGTGTTGAGCACACAGCACCG-----					

Figure 2 (suite)

8/16

DEF4	1050	1060	1070	1080	1090	1100
	GCTAACACCAATCTCGCTGCAGCTTGGCCACCATCCTAAGG-GACCTCTGACAGACATTT					
DEFX	-----TCTTGCTGCCACCTTGGCCCCCTCCCTCTGAGACCTCTGAGACACATTT					
	1070	1080	1090	1100	1110	
DEF4	1110	1120	1130	1140	1150	1160
	-AGGTGTCAACGCAATCATTTGATGAGTCCTTGGCTGGAT--GACCTAGACACATCATTTA					
DEFX	-----NAGCTCTCACCTAALAAATCTCAGGATTCTAGGCCAANCGGTCTAACAAATTGTTCA					
	1120	1130	1140	1150	1160	1170
DEF4	1170	1180	1190	1200	1210	1220
	GGCTTGAACATATCTAACGGCAAGCAAAAAGGTGACTGTCCCCCTCTAGGAA-CCACATGCT					
DEFX	-----CTCT-GAACTCTCTAACGGTCAAGAGAAGAGGTGGTTGCTCCCCCTCTAACAGAACACATGTT					
	1180	1190	1200	1210	1220	
DEF4	1230	1240	1250	1260	1270	1280
	ATATGCACATCCTTACTCGGGAGCCTGCAAC---CTGCCCTATCCAGCAACACAAGCC					
DEFX	-----GCATGTACATCCTTAATTCCGAAAGTCAACAAACCTGCCCTGCTTAGCAACACAAGCC					
	1230	1240	1250	1260	1270	1280
DEF4	1280	1290	1300	1310	1320	1330
	CAGGCG-TATTCACTCATCCAGGTATTCTCCAAC---CTTACTTGTCTGAATGGCTTG					
DEFX	-----GAGGTGGTACTCC-TCTCACCCGGGCATTCTCCAACACACCTGTTGTCCAAACAGCTTT					
	1290	1300	1310	1320	1330	1340
DEF4	1340	1350	1360	1370	1380	1390
	GATTTGTTTTATGGTAGACCCCAGGG-CCTGGGAGGTCAAGTCAGACCACATTCAA					
DEFX	-----GATTTGTTTTATAGTTGGACCCCAGGTTCCAGGAGGCTGGTTAGGCCATATTCAA					
	1350	1360	1370	1380	1390	1400
DEF4	1400	1410	1420	1430	1440	1450
	TCCTCATCTGTGTGGTGGCATTGATCCTAGTCTCCTCGCAAGGTGTATACAACAA					
DEFX	-----TCCTCATCTGTGTGGTGGCATTCTAGCCTCTACAGGGTGGATACTATGA					
	1410	1420	1430	1440	1450	1460
DEF4	1460	1470	1480	1490	1500	1510
	TATGCAGGCCAGGCTCCCTGGTGGCTTAAATATTCCCTCGGTCCAGGTAGTTCAGCCT					
DEFX	-----TACACAG-CCAGGCTGCCCCAGTGGCTTCAATATTCTTTGGTCCAGATAAGTTCAGCCT					
	1470	1480	1490	1500	1510	1520
DEF4	1520	1530	1540	1550	1560	1570
	CAGCCACCAGCATAGGTATCATGGGGTCAATTGTCTTAGGAGTCATGAGGAATCCACAGT					
DEFX	-----CAGC-ACCAAGTGTAGGCATCACAGGGTCAATTGTCTTAGGAGTCATGGAGAATTCAAGT					
	1530	1540	1550	1560	1570	1580

Figure 2(suite)

9/16

DEF4	1580	1590	1600	1610	1620	1630
	TGATTGCTGCCCTGGGCCTGGCCAGGGCTGACCAAAGTAGACGAGGGGTGGTACCTCCGT					
DEFX	1590	1600	1610	1620	1630	
	TGGTAGCTACCTGGGCCTGGCCAGGGCTGACCA---TAGACAAGGCATC---CCTCTGT					
DEF4	1640	1650	1660	1670	1680	1690
	GGACTCCTGCTTGAACTCCAGCTTCTGCCAAATTCTCAACTGCCCTCTTAAACAGTTA					
DEFX	1640	1650	1660	1670	1680	1690
	GAACTCCTATTTAATGCCAGCTTCCCAACAAATTCTCAACTGCTCTTACCAAGCAGGTA					
DEF4	1700	1710	1720	1730	1740	1750
	CAAT box					
	TTTAAAGTACCCAAATAGAAAGTAACGCTGAAAAATTAGGACACCTGATACCAAAAGACCC					
DEFX	1700	1710	1720	1730	1740	1750
	TTTAAACTACTCAATAGAAAGTAACCCCTGAAAA-TTAGGACACCTGTTCCCAAAAGACCC					
DEF4	1760	1770	1780	1790	1800	
	TATA box					
	TTAAATAAGG-AAGTCCTCTC-CTCTGTGTGCATGGCTGCTCTG---CTACATAAGACC					
DEFX	1760	1770	1780	1790	1800	
	TTAAATAAGGGAAAGTCCTTCNCTGCTGTGCACAGCTGCTGATGTGGCAACATGAGGCC					
DEF4	1810	1820	1830	1840	1850	1860
	mRNA start --> SpSite					
	TGGAACACAGGACTGCTGTGCCCTCTGCTCGCCCTGCCCTAGCTTGGAGGATCTGTAA					
DEFX	1820	1830	1840	1850	1860	1870
	TGGGACAGGGACTGTCCTCTGCCCACTCTGGTAGCCTCACGTAGCTTAACAATCTGTCA					
DEF4	1880	1890	1900	1910	1920	
	GTAACACAA---AACTTAAACTTACACATTGAGGTTTCAATATTGAAGCTGTGCCCC					
DEFX	1880	1890	1900	1910	1920	1930
	GTAATACAATACAAAACCTTAAACTTACATACTGGGTTCCACCCAGGAAGCTGTGTTCCC					
DEF4	1930	1940	1950	1960	1970	1980
	AGTCTGACCTCTCACTGTGGGCCACCCCCAGAGGGACCCAGCGTGAAGCCCTGCTGTGAA					
DEFX	1940	1950	1960	1970	1980	1990
	AATCTGACCCGTGATTATGGGCCACCTCAGAGGGNACCCAGTGAGGGAA-TATTTG--					
DEF4	1990	2000	2010	2020	2030	2040
	CTTCTATCTGGGTGTCGGCGCTGCTGGGGTAATGGCTACTAGCTAAGTCATAGAGA					
DEFX	2000	2010	2020	2030	2040	
	---CCATCTGGGA--CTGTTGGTGCCTGGGGCAGTGGCTATGAGCTCAGTTAATA---					

Figure 2 (suite)

10/16

DEF4	2050	2060	2070	2080	2090	2100
	AACTCAAAAAAGTTCCCTTCCAAACACACAGTGTCTACTTGACATGTCCAATAAGACGAT					
DEFX	2050	2060	2070	2080	2090	2100
	AACTCAAGCAGTCCCTTCCAAACACACATGTCTACTTAAACGTGTCCAACAGAGATGAT					
DEF4	2110	2120	2130	2140		
	CA---CAGCTCT---TAACATTA-TTTTATTGTGAGAGAAGCCCTCT-----					
DEFX	2110	2120	2130	2140	2150	2160
	CATACTCATANGCTGCTAAACATTANTTTATTGAGAAAAGCTTATTCATGTTCTTG					
DEF4	2170	2180	2190	2200	2210	2220
	-----GCAG-----GTC---CTA---					
DEFX	2170	2180	2190	2200	2210	2220
	GCCCATGGAGTTTCATTNATTANTTTATTGAGAGATGGAGTCTCACTATGT					
DEF4	2230	2240	2250	2260	2270	2280
	-----GGTCT-----GTTTTC-----					
DEFX	2230	2240	2250	2260	2270	2280
	TGCTCAAGCTGGTCTCCAACTCCTGGGCTCAAGCGATCTCCTACTTGGCCTTGAAAG					
DEF4	2290	2300	2310	2320	2330	2340
	-----AATCAGGTT-----					
DEFX	2290	2300	2310	2320	2330	2340
	CGCTGAGATTGCCTGTGAGCCATCATGGGGCTCACTGGCCCCTGATTAAATCAGATT					
DEF4	2350	2360	2370	2380	2390	2400
	2180 2190 2200 2210 2220 2230					
DEFX	2350	2360	2370	2380	2390	2400
	GTTGTTTTGCTATTGA-GTTGTTGACTCCTATGTATTGAGATATTACCCCTTC					
DEF4	2410	2420	2430	2440	2450	2460
	-----AATTGTTTTGCTATTGAANTTGGTACTCCTGTATATTGGATATTACCCATTTC					
DEFX	2410	2420	2430	2440	2450	2460
	TACACGTAGGGTTGCAAATATTCTCTCATGTTCTGTGTTGCCTTCACTCAGTTG					
DEF4	2470	2480	2490	2500	2510	2520
	2240 2250 2260 2270 2280 2290					
DEFX	2470	2480	2490	2500	2510	2520
	ATGGTTCTTGCTGTGCAGGTGCTTAGTGTCAACGCAGCCCCGCTTGTCTATTTC					
DEF4	2530	2540	2550	2560	2570	2580
	2300 2310 2320 2330 2340 2350					
DEFX	2530	2540	2550	2560	2570	2580
	ATTGTTCTTGCTATGAAGATGCTTAGCCTCAATGCAGCCCCGCTTGTCTATTTC					
DEF4	2590	2600	2610	2620	2630	2640
	2360 2370 2380 2390 2400 2410					
DEFX	2590	2600	2610	2620	2630	2640
	CCATTGTTATTGCCTGTGCCTTGGTGTAGCCAAGAAATCTTACTCACGTCAT					
DEF4	2650	2660	2670	2680	2690	2700
	2360 2370 2380 2390 2400 2410					
DEFX	2650	2660	2670	2680	2690	2700
	C-ATTT---TATTGCCTGTCCCTTGATGTAGCCAAGAAATATTGCCAGATTAAT					

Figure 2 (suite)

11/16

DEF4	2420	2430	2440	2450	2460	2470
	G'TCCAAA-GCTTTATCTTGT'ATGTGCTCTCGTAG'ITGTATGGTTTCAGGTCTTTCAA					
DEFX	2590	2600	2610	2620	2630	
DEF4	2480	2490	2500	2510	2520	2530
	GT'CTATGTTGAG-TCT'CAATCCATGTTGAGCTGATTTT-TACATGTTGAGAGAAG					
DEFX	2640	2650	2660	2670	2680	2690
DEF4	2540					
	GACCACGTGTATGCACCT-----					
DEFX	2700	2710	2720	2730	2740	2750
DEF4	2550	2560			2570	
	-----AGC---AACTCATGAAC-----CTTACA--CAACTCTT					
DEFX	2760	2770	2780	2790	2800	2810
DEF4	2580	2590	2600	2610	2620	2630
	ATCTCTCACTGAGCTCATTCACCTGTACCCCTGATAAGGTCAATTGCTCTTCACTCT					
DEFX	2820	2830	2840	2850	2860	2870
DEF4	2640	2650	2660	2670	2680	2690
	GGCCCCTACAGGAGACTACTCACCCCATACCTCAGTCGCCCCCTTCATGAGGGT-ATAAT					
DEFX	2880	2890	2900	2910	2920	2930
DEF4	2700	2710	2720	2730	2740	2750
	GACCTAGAACGCTGCAATGAGTTACT-CTCTACTCCACCGGAATTCAAGGTCTGGCACCAG					
DEFX	2940	2950	2960	2970	2980	2990
DEF4	2760	2770	2780	2790	2800	2810
	TGTAGACCT--GAAGAGAATAGTAGGGCCCATTATCAGGAAATAAGAGGCATTTGCTC					
DEFX	3000	3010	3020	3030	3040	
DEF4	2820	2830	2840	2850	2860	2870
	TCTTAAATTATTGAATGAAAGCACTGTTCCATT-CTTTTAAAGATTTAAC					
DEFX	3050	3060	3070	3080	3090	

Figure 2 (suite)

12/16

DEF4	2880	2890	2900	2910	2920	2930
	CAGGAATATTAGGTATTCCCTGAAAAACAGGAAATAATGCCAGGGTCCCTCATCATCACCA					
DEFX	3100	3110	3120	3130	3140	3150
	::: ::::: :: : ::::: :: : ::::: :: : ::::: :: : ::::: ::					
DEF4	2940	2950	2960	2970	2980	
	TCAACTTCACCTAGGCACAGACACTAAACATAGAGCTTC---CTGTGAAGAAGCTGGG					
DEFX	3160	3170	3180	3190	3200	3210
	::: :: : :: : :: : :: : :: : :: : :: : :: : :: : ::					
DEF4	2990	3000	3010	3020	3030	3040
	AGAGCAGAGGAGGCATTCCAGGGATGTCAAGGCCAATAGGAGTCGGCATCCCTCTCTAA					
DEFX	3220	3230	3240	3250	3260	3270
	::: ::::: :: : : :: : :: : :: : :: : :: : :: : ::					
DEF4	3050	3060	3070	3080	3090	3100
	AAATGCACACCTCCTCTCACTCAGAAGGCCAAAGGTTCTATCTCTGTGCCTCTCCCA					
DEFX	3280	3290		3300	3310	3320
	::: :: : :: : :: : :: : :: : :: : :: : :: : ::					
DEF4	3110	3120	3130	3140	3150	3160
	GAA-AGCTATAAAATCCAAGCTGGCTTCTCCCTCCACACAGCTGCTCCTGCCTCTCC					
DEFX	3330	3340	3350	3360	3370	3380
	::: :: : :: : :: : :: : :: : :: : :: : :: : ::					
	----- exon2 -----					
DEF4	3170	3180	3190	3200	3210	3220
	CTC---CAGGTACCCAGCCATGAGGATTATCGCCCTCCTCGCTGCTATTCTCTTG					
DEFX	3390	3400	3410	3420	3430	3440
	::: :: : :: : :: : :: : :: : :: : :: : :: : ::					
DEF4	3230	3240	3250	3260	3270	3280
	TAGCCCTCCAGGTCCGGGCAGGCCACTCCAGGCAAGAGGTGATGAGGCTCCAGGCCAGG					
DEFX	3450	3460	3470	3480	3490	3500
	::: :: : :: : :: : :: : :: : :: : :: : :: : ::					
DEF4	3290	3300	3310	3320	3330	3340
	AGCAGCGTGGGCCAGAAGACCAGGACATATCTATTTCCTTGCATGGATAAAAGCTCTG					
DEFX	3510	3520	3530	3540	3550	3560
	::: :: : :: : :: : :: : :: : :: : :: : :: : ::					

Figure 2 (suite)

13/16

----->

DEF4 3350 3360 3370 3380 3390 3400  
 CTCTTCAGGTTTCAGGTGAGAGAGGCCAGCATAAAGCTACCGAGTCTAGAGAGACGG  
 ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::  
 DEF5 3570 3580 3590 3600 3610  
 CTCTTCAGGTTCCAGGTGAGAGATGCCAGCATGCCAGA-CCTAC--AGACTAGACACAGAAGG

DEF4 3410 3420 3430 3440 3450 3460  
 ATGGCAGATGGGCTCTGGAAATCACATCTCAATGGTGGATGTCACTTAGGTGGCTTTACTT  
 ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::  
 DEF5 3620 3630 3640 3650 3660 3670  
 ACAGGAGACAGGCTCTGGAAATGGATCTCAGTGGCAGATGTCACTTAGGTGGCTATACTT

DEF4 3470 3480 3490 3500 3510 3520  
 ACCATCTCTGGGCCTCGATTTCTTATCTCGAAACTGAATAGAGAGACAAACAAATGTAA  
 ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::  
 DEF5 3680 3690 3700 3710 3720 3730  
 AACATCTCTGGTCCTGGATTTCTCATATCTAAATGGAAATAGAGAAACCAAAGAAAATCTAA

DEF4 3530 3540 3550 3560 3570 3580  
 GT-AGTCTTCTTCTCCAAAGACTTGATTCCAAGGTATGTCTATAAAATTGGCTAGGGTT  
 ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::  
 DEF5 3740 3750 3760 3770 3780 3790  
 GAGATTTCTTCTCCAAAATTGATTCCAAGATATGACTGTGAAATTCACTAGATTT

DEF4 3590 3600 3610 3620 3630  
 AAGATATGGAGAGACAGATTGACCAGTTCTTCTGGATCTAAACAGTA-GAT--ATTAT  
 ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::  
 DEF5 3800 3810 3820 3830 3840 3850  
 AAGATATAAGGAGATG--CTACCTAGTTCTGGAGCCAGCAAAACAGCTTAAGTAT

DEF4 3640 3650 3660 3670 3680 3690  
 AG-GGAAAATATTCATTCTGCCAACAAAGGAAATTAAAGCTGGAGATGGGCTTAAG  
 ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::  
 DEF5 3860 3870 3880 3890 3900 3910  
 ATAGGAAAATATTCACCCCTGTCTATATAGGAGTTTAGAACCTGGAGAGGAGCTAAG

DEF4 3700 3710 3720 3730 3740 3750  
 AGTATGTTCAAGGTGTGTCTGATGGGCA--AAAGCACACAAATCAGAGCAAAAGAGAA  
 ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::  
 DEF5 3920 3930 3940 3950 3960 3970  
 AATGTGTTCAAGGTGTGTGATGGG-CAGGAATGCAGAAAAGTGA-AGCAAAGGAGAA

DEF4 3760 3770 3780 3790 3800 3810  
 TGAGTCTCAAATCCTGTATGAGCAGCATTGCTCTGTATTTATTCTATTGACTAAGGT  
 ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::  
 DEF5 3980 3990 4000 4010 4020 4030  
 TGAGTCTCGAACCTGTGTGACCAGCACTGCTCTGTATTTATTCTATTGACTGAGAT

DEF4 3820 3830 3840 3850 3860 3870  
 TGTTTGTGCTACCGGCACTAATGCAGCCAGCATCACCAGTCAGCCAGCATGTGCATTCTC  
 ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::  
 DEF5 4040 4050 4060 4070 4080 4090  
 TGTTTGTGCTACCGGCTGTAATACAGCCAACATCACTCATCAGCCAACATGTGACTTCTC

Figure 2 (suite)

14/16

DEF4 3880 3890 3900 3910 3920 3930  
 CAAGATCCCTTTACCAACCCACCGCTGACCTGGTCTTAAATTCTCAGTCCTCCTCTGT  
 ::::::::::::::::::::: :::: : : :: : :::: : :: : :::::  
 DEFX 4100 4110 4120 4130 4140 4150  
 CAAGATCCCTTTACCAACCCACTGCTGNACCCCGTACTCAGTTCTGATGCTCTCTCTGG  
  
 DEF4 3940 3950 3960 3970 3980 3990  
 GTTCCCAGGCTCAACAAAGGGGCATGGTCTGCTCTTGCAGATTAGTATTCTGCCGGCGAAC  
 :: ::::::::::::::: :::: : : :: : :::: : :: : :::: : :::  
 DEFX 4160 4170 4180 4190 4200 4210  
 GTCCCCAGGCTCAACAAAGGGCTTGATCTGCCATTGCAGAGTACTATACTGCATTTTGG  
  
 DEF4 4000 4010 4020 4030 4040 4050  
 AGAACTTCGTGTTGGGAACTGCCCTCATGGTGGTGTGAGTTTCACATACTGCTGCACGCG  
 ::::: :: : :: : :: : :: : :: : :: : :: : :: : :: : :::  
 DEFX 4220 4230 4240 4250 4260 4270  
 AGAACATCTGGTGGGACCTGCTTCATCCTGGTGAACGCTACCCAATCTGCTGCT---  
  
 DEF4 4060 4070 4080 4090 4100 4110  
 TGTCGATTAACATTCTGCTGTCCAAGAGAATGTCATGCTGGAACGCCATCATCGGTGGT  
 :: :::  
 DEFX -----ACTAA-----  
  
 DEF4 4120 4130 4140 4150 4160 4170  
 GTTAGCTTCACATGCTCTGCAGCTGAGCTTGAGAAATAGAGAAAAATGAGCTCATAATT  
 ::::::: ::::::: :: : :: : :: : :: : :: : :: : :::  
 DEFX 4280 4290 4300  
 GCTTGCAGACTAGAGAAAAA-GAGTTCTATAATT  
  
 DEF4 4180 4190 4200 4210 4220 4230  
 TGCTTGAGAGCTACAGGAAATGGTTCTCCTATACTTTGTCCTAACATCTT-TCT  
 :: ::::::: :: : :: : :: : :: : :: : :: : :: : :::  
 DEFX 4310 4320 4330 4340 4350 4360  
 TTCTTGAGCATTAAAGGGATTGTTATT---CTTATACCTTGTCCCTCGATTTCCTGTCC

Poly Ad

DEF4 4240 4250 4260 4270 4280 4290  
 TGATCCTAAATATATATCTCGTAACAAGATGTCTTGTACACCTCTTGAATTTGAT  
 :: ::::: ::::: :: : ::::::: :: : :: : :::  
 DEFX 4370 4380 4390 4400 4410  
 TCATCCCAAATAAAATACCTGGTAACATGATTCCGGGTTTTTTTTTT

Figure 2 (suite)

15/16

DEF4	10	20	30	40	50	60
	GTCTGCCCTCTGCTGCCCTGCCAGCTTAGGATCTGTCAACCCAGCCATGAGGATT					
DEFX	CTCTGCCCACTCTGGTAGGCTCACGTAGCTTAACAACTGTGACTACAGTTATGAGGACC					
	10	20	30	40	50	60
DEF4	70	80	90	100	110	120
	ATCGCCCTCCCTGGCTGCTATTCTCTGGTAGGCCCTCCAGGTCCCCGGCAGGGCCCACTCCAG					
DEFX	CTCACCCCTCCCTCTGCCCTTCTCCCTGGTGGCCCTTCAGGGCTGGCAGAGCCGCTCCAG					
	70	80	90	100	110	120
DEF4	130	140	150	160	170	180
	GCAAGAGGTGATGAGGCTCCAGGCCAGGAGCAGCGTGGCCAGAAGACCAAGGACATATCT					
DEFX	GCAAGACCTCATGAGATGCCAGGCCAGAAGCACCCCTCCAGCAGATGACCAGGATGTGGTC					
	130	140	150	160	170	180
DEF4	190	200	210	220	230	240
	ATTCCTTGCATGGATAAAAGCTCTGCTCTCAGGTTTCAGGCTCAACAAGGGGCATG					
DEFX	ATTTACTTTCAAGGAGATGACAGCTGCTCTCAGGTTCCAGGCTCAACAAAGGGCTTG					
	190	200	210	220	230	240
DEF4	250	260	270	280	290	300
	GTCTGCTCTGCAGATTAGTATTCTGCCGGCGAACAGAACCTCGTGTGGAACTGCC					
DEFX	ATCTGCCATTGCAGAGTACTATACTGCATTGGAGAACATCTGGTGGACCTGCTTC					
	250	260	270	280	290	300
DEF4	310	320	330	340	350	360
	ATGGTGGTGTGAGTTACACATACTGCTGCACCGCGTGTGATTAACTGTTCTGCTGTCAA					
DEFX	ATCCTTGGTGAACGCTACCCAACTGCTG-----CTACTAA-----					
	310	320		330	340	350
DEF4	370	380	390	400	410	420
	GAGAAATGTCATGCTGGAACGCCATCATCGGTGGTGTAGCTTACATGCTCTGCAGCT					
DEFX	-----					
	360	370	380			390
DEF4	430	440	450	460	470	480
	GAGCTTGCAGAAATAGAGAAAAATGAGCTCATAATTGCTTGAGAGCTACAGGAAATGGT					
DEFX	--GCTTGCAGACTAGAGAAAAA-GAGTTCATAATTTCCTTGAGCATTAAAGGGAAT--					
	400	410	420	430	440	450
DEF4	490	500	510	520	530	
	TGTTTCTCCTATACTTTGTCCTAACATCTT-TCTTGATCCTAAATATATCTCGTAAC					
DEFX	TGTTATTCTTACCTTGTCCCTGATTTCTGTCCCTACCCAAATAACTTGGTAAC					
	460	470	480	490	500	510
DEF4	540					
	AAG					
DEFX	ATG					

Figure 3

16/16

<----- Signal peptide -----><--  
 5 10 15 20  
 MetArgThrLeuThr LeuLeuSerAlaPhe LeuLeuValAlaLeu GlnAlaTrpAlaGlu

----- Propiece -----  
 25 30 35 40  
 ProLeuGlnAlaArg AlaLysGluMetPro AlaGlnLysGlnPro ProAlaAspAspGln

----- Propiece -----  
 45 50 55 60  
 AspValValIleTyr PheSerGlyAspAsp SerCysSerLeuGln ValProGlySerThr

-----><----- Mature peptide ----->  
 65 70 75 80  
 LysGlyLeuIleCys HisCysArgValLeu TyrCysIlePheGly GluHisLeuGlyGly

----->----- Mature peptide ----->  
 85 90 94  
 ThrCysPheIleLeu GlyGluArgTyrPro IleCysCysTyr

Figure 4

	SIGNAL	PROPIECE
DEF4_HUMAN	MRIIALLAAILLVALQVRA	GPLQAR-----GDEAPGQ-EQRGPEDQDISISFAWDKSS
DEF5_HUMAN	MRTIAILAAAILLVALQQAQA	ESLQER-----ADEATTQ-KQSGEDNQDLAISFAGNGLS
DEF6_HUMAN	MRTLTIITAVLLVALQAKA	EPLQAEDDPLQAKAYEADAQ-EQRGANDQDFAVSFAEDASS
DEF1_HUMAN	MRTLAILAAAILLVALQQAQA	EPLQAR-----ADEVAAAPEQIAADIPEVVVSLAWDESL
DEFX	MRTLTLLSAFLVALQAWA	EPLQAR-----AHEMPAQ-KQPPADDQDVVIYFSGDDSC
	*** ... * * * * *	***

	PROPIECE	Mature PEPTIDE
DEF4_HUMAN	ALQVSGSTRGM	VCSCLVFCRRTELVRGNCLIGGVSFYCCTRVD
DEF5_HUMAN	ALRTSGSQARA	TCYCRTGRCATRESLSGVCEISGRLYRLCCR---
DEF6_HUMAN	SLRALGSTRAF	TCHCRR-SCYSTEYSYGTCTVMGINHRFCCL---
DEF1_HUMAN	APKHPGSRKNM	ACYCRIPACIAGERRYGTCIYQGRLWAFCC---
DEFX	SLQVPGSTKGL	ICHCRVLYCIFGEHLLGGTCFILGERYPICCY--
	***	***
	^ ^	^ ^

Figure 5

LISTE DE SEQUENCES(1) INFORMATIONS GENERALES:

## (i) DEPOSANT:

- (A) NOM: GENSET SA
- (B) RUE: 24 RUE ROYALE
- (C) VILLE: PARIS
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 75008

(ii) TITRE DE L' INVENTION: POLYPEPTIDE DEFENSINE HUMAINE Def-X, ADN GENOMIQUE ET ADNc, COMPOSITION LES CONTENANT ET APPLICATIONS AU DIAGNOSTIC ET AU TRAITEMENT THERAPEUTIQUE

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 6

## (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 4415 PAIRES DE BASE
- (B) TYPE: NUCLEOTIDE
- (C) NOMBRE DE BRINS: DOUBLE
- (D) CONFIGURATION: LINEAIRE

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

## (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Homo sapiens

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: Exon 1
- (B) EMPLACEMENT: 1836..1874

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: Exon 2
- (B) EMPLACEMENT: 3394..3577

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: Exon 3
- (B) EMPLACEMENT: 4161..4380

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: start CDS
- (B) EMPLACEMENT: 3406..3408

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: stop CDS
- (B) EMPLACEMENT: 4276..4278

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: site de polyAdenylation
- (B) EMPLACEMENT: 4374..4379

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 1:

ACACCATTG TCTTCATGTA ACCCCATTAG CTATACCTC TAGTGCAGG AAACCATAGG	60
GCCTAGGTCA CACCATGAGG CTGCNCTTAC AAGTTATGCA AAAACTATGG ACTTGGGAGA	120
CCTGTGCGTA ACAACATCAC ACNCCAAATT TAACCAGCTC TCCCCATAAC AGCACCGCTCA	180
TGTGTTACTG AGGAAATGCC TGTGGATTGG AGTGTGTTCT GTGTGCAGGA GGCTGGTCCA	240
GGTTTCACTT CTGCAGGACA CTGGACGTTT CCCAAACCA GCAGACTTTC CCCACGTGCA	300
CACACACCCC TTCTCATTTC GCCTCTACAT CCATATCCAC TGGGCCCTTC AGGCACCTAC	360
TAATGCCCTA GAAACCTAATAA CCATCATCTG GGGCCCAAGT CCCTGAATGG CCCTAAATCTC	420
TTCCCTGTGCT GGAATGAGTC CAGTGCACAC TTCCCTCCAC GGTGAATTTG CTGGGCTGCT	480
ACAGATCAGG AACTCACTGC TTCCCTCATAG GGGCAGCCGA CTTCACTGCT CTGCAACAGC	540
GACCACCCCT AGCGAGGCTT GAGATGCCTC TTGCCTCCCTT AAGACTGAGG GAGACGCTTC	600
AGCTCTCACT CCACTGCCCA AAGTCCTCCA CAGCGCGGTG CCTGCTGCCT TCACACAGAG	660
CTGCAGGGGN AGGTCCGTG TATCCGGCCT GCTGGACAG CGCTGTGCAC AACCCCTCCCA	720
TGGCAACAGT GGCTGCCCG CCTGCACACT GGGCTTGGCA ACCTCGCTGT AGGTATTTAT	780
TCCCTCAGGA GTGACTGCAT TCTTTCCCA TTTCCAGAAA ACTGATGCCA TTTACCTCAC	840
TATGAGGAGG AGGAGGAGGA GGAGGGTGGA GAGTGGTACA TTTAAAATG TGCACATATT	900
TCCCTAGGAC TCCCCCTCAA ATAACCCAGG AGGGACCATA CCAGCTCAATT CCTGTGTATC	960
CCAAGCATAN GAGTAATCAT CCCACTCATG CTGAGTGTAT GGTGGCCATT AAGCCTGCC	1020
TGAACGGCT TTACAAACAAG GTGTTTGAGC ACACAGCACC GTCTTGCTGC CACCTGGCC	1080
CCCTCCCTTG TGAGACCTCT GAGACACATT NAGGTCTCAC CTAAAAATCT CAGGATTCT	1140
AGGCCAAAN CGGTCCCTAAA AAATTGTTCA GTCTGAACTC TCTAAGGTCA AGAGAAGAGG	1200

TGGTTGCTCC	CTCTAAGAAA	CCACATCTTC	CATGTACATC	CTTAATTCCG	GAAGCTCCAA	1260
CAACCTGCC	CTGCTTAGCA	ACACAAAGCCG	AGGTGGTACT	CCCTCTCACCC	GGGCATTCTC	1320
CAACACACCT	CTTGTCCAA	ACAGCTTTGA	TTTGTTTTA	TAGTTGGACC	CCAGGGTCCC	1380
AGGACGGCTGG	TTCAGGCCAT	ATTCCAAATC	CTCATCTGTG	TCTGAGTGGC	ATTCTTAGCC	1440
TAGCCCTCCCT	ACAGGGTGGA	TACTATGATA	CACAGCCAGG	CTGTCCCAGT	GGCTTTCAAT	1500
ATTCTTTGG	TCCAGATAGT	TCACCCCTCAG	CACCAAGTGT	GGCATCACAG	GGTCAAATTGT	1560
CTTACGAGTC	ATGGAGAATT	CATAGTTGGT	AGCTACCTGG	GCCTGGCCAG	GGCTGACCAG	1620
AGACAAAGCA	TCCCTCTGTG	AACTCCTATT	TTAATGCCAG	CTTCCCAACA	AATTCTCAA	1680
CTGCTCTTAC	CACCAAGGTAT	TTAAACTACT	CAATAGAAAG	TAACCCCTGAA	AAATTAGGACA	1740
CCTGTTCCCA	AAAGACCCCTT	AAATAGGGGA	AGTCCTTCN	CTGCTTGTGC	ACAGCTGCTG	1800
ATGTGCCAAC	ATGAGGCCCTG	GGACAGGGGA	CTGTCCCTTG	CCCACTCTGG	TAGCCTCACG	1860
TAGCTTAACA	ATCTGTCAGT	AAATACAATAC	AAAACCTAAA	CTTCATAACT	GGGGTTCCAC	1920
CCACGGAAAGCT	GTGTTCCCAA	TCTGACCCGT	GATTATGGGG	CCACCTCAGA	GGGNAACCCAG	1980
TGAGGGAAATA	TTTGCCATC	TGGGACTGTT	GGTTGCTGGG	GGCAGTGGCT	ATGAGCTCAG	2040
TTAAATAAACT	CAAGCAGTTT	CCTTCCAAAC	ACACATGTCC	TACTTAAACGT	CTCCAAACAGA	2100
GATGATCATA	CTCATANGCT	GCTAAACAT	TANTTTATT	TTGAGAAAG	TCTATTACATG	2160
TTCTTGGCCC	ATGGAGTTT	CATTNATTA	NTTTATTAT	TTTGCAGAGA	TGGAGTCTCA	2220
CTATGTTGCT	CAAGCTGGTC	TCCAACCTCT	GGGCTCAAGC	GATCTTCCTA	CTTTGGCCCTT	2280
TGAAAGCGCT	GAGATTGCCT	GTGTGAGCCA	TCATGGGGC	TCACTGGCCC	ACTGATTAAT	2340
CAGATTAATT	GTTTTTGCT	ATTGAANTTG	TTGACTTCC	TTGTATATTC	GGATATTTAC	2400
CCATTCTAAC	ACGTAGGGTT	TGCAAATATT	TTCTCTCATG	TTCTGTGTTG	CTTTTCACACT	2460
CAGTTGATGG	TTCCCTTGTC	TGTGCAGGTG	CTTAGTGTT	CAACGCAGCC	CCGCTTGTCT	2520
ATTTTCCATT	TTATTGCCTG	TCCCTTGAT	GTCATAGCCA	AGAAATAATT	GCCCAGATT	2580
ATGTCAAAAA	GCTTATCCC	TATATATTCT	TCTAGTAGTT	TATGGTTCA	GATCTTATGT	2640
TTAGGTCTTC	AATCCATGAA	GTTGATTTTT	GTATGTGGTA	TAAGAAAAAA	GACCACATGT	2700
ATACATATCT	CAAATTCTAA	GGTAGTATAT	ATTAGACACA	TACAATGTGT	CTATTACAC	2760
ACATTGAGCT	AAAAATAATA	AACATATTAA	TATCTTCAA	TCAACTCTAT	CTCTATCTCA	2820

CTGAACTTGT	TTCACCTATA	GCCTGATGAG	GTTGCTGTCC	TCTCTACCCC	AGCTCCTATA	2880
GGACACTGCT	CATCCCCATA	CCTCAAAAC	CCCTTCATGA	GGGTGATAAT	GCCCTTGAAAT	2940
CCTCCAAATGA	ATTACTTCTC	TACTACAGTG	GAATTCAAGGT	CTGTTATGAG	GGTCTGGATC	3000
TCTGAAGAGA	AGAGCTCTCA	TTTTCAAGAAA	ATAAGCAGGA	TTTATTCCCT	GAATTACTG	3060
AAATTAAATCA	CTGTTTCGAT	TACTTTTGC	AAATATTAAA	GTAAATATT	AAACAGGTAA	3120
AAACAGAAAT	AAATGGTAGGG	TCCTTATCAT	CACCGTGAAT	TCCAAAGCTAG	CATAGACACT	3180
AAACCTAGAG	ATTACACACTA	GAATGAAAGC	TGGGAGAGCA	GAGGAGTCTC	AGAAGGATGT	3240
GGAGGCCAAAT	GGACACCTGC	AAACCTCTCCA	ACGAAATGCC	TACCTCCTCT	CACTCCAGCA	3300
TCCATCTCTG	AGCCTTCTCG	CAGCAGAGCT	AAATATTCAAG	CCTGGCTCCT	CCGTTCCCAC	3360
ACATCCACTC	CTGCTCTCCC	TCCTCTCCTC	CAGGTGACTA	CAGTTATGAG	GACCCTCACC	3420
CTCCTCTCTG	CCTTTCTCCT	GGTGGCCCTT	CAGGCCTGGG	CAGAGCCGCT	CCAGGCAAGA	3480
GCTCATGAGA	TGCCAGCCCA	GAAGCAGCCT	CCAGCAGATG	ACCAGGATGT	GGTCATTTAC	3540
TTTTCAAGGAG	ATGACAGCTG	CTCTCTTCAG	GTTCCAGGTG	AGAGATGCCA	GCATCCAGAG	3600
CTACAGACTA	GACAGAAGGA	CAGGAGACAG	GCTCTGGAAT	TGGATCTCAAG	TGGCAGATGT	3660
CACTTAGGTG	GCTATACTTA	ACATCTCTGG	TCCTGGATT	TCTCATATCT	AAATGCCATA	3720
GAGAAGCAAA	GAATCTAAG	AGATTTTCT	TTCTCCAAA	ACTTGATTCC	AAAGATATGAC	3780
TGTGAATTC	ACTAGATTAA	AGATATAAGG	AGATGCTACC	TAGTTCCCTTC	TGGAGCCAGA	3840
CAAACAAGCT	TAAGTATATA	GGAAAATATT	TCACCCGTGC	TATATAGGAG	GTTTTAGAAC	3900
CTGGAGAGGA	GCCTAAGAAT	GTGTTCAAGGT	GTGTGTGTGA	TGGGCAGGAA	TGCAGAAAAG	3960
TGAAGCAAAG	GAGAATGAGT	CTCGAATCCT	GTGTGACCAG	CACTGCTCTG	TGTATTATT	4020
CCTATTGACT	GAGATTGTTT	GTGCTACCGG	CTGTAATACA	GCCAACATCA	CTCATCAGCC	4080
AAACATGTGAC	TTCTCCAAGA	TTCCCTTTAC	CACCCACTGC	TGNACCCCGT	ACTCAGTTTC	4140
TGATGCTCTC	TCTGGGTCCC	CAGGCTCAAC	AAAGGGCTTG	ATCTGCCATT	CCAGAGTACT	4200
AAATCTGCATT	TTTGGAGAAC	ATCTTGGTGG	GACCTGCTTC	ATCCTTGGTG	AAACGCTACCC	4260
AAATCTGCTGC	TACTAAGCTT	GCAGACTAGA	GAAGAGAGT	TCATAATT	TTTGAGGCAT	4320
TAAAGGGAAT	TGTTATTCTT	ATACCTTGTG	CTCGATTCC	TGTCCTCATC	CCAAATAAAT	4380
ACTTGGTAAC	ATGATTCCG	GGTTTTTTT	TTTT			4415

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 453 PAIRES DE BASE  
 (B) TYPE: NUCLEOTIDE  
 (C) NOMBRE DE BRINS: DOUBLE  
 (D) CONFIGURATION: LINEAIRE

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(vi) ORIGINE:  
 (A) ORGANISME: Homo sapiens

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 2:

CTCTGCCAC TCTGGTAGCC TCACGTAGCT TAACAATCTG TGACTACAGT T	ATG	AGG	57
	Met	Arg	-
	1		
ACC CTC ACC CTC CTC TCT GCC TTT CTC CTG GTG GCC CTT CAG GCC TGG			105
Thr Leu Thr Leu Leu Ser Ala Phe Leu Leu Val Ala Leu Gln Ala Trp			
5	10	15	
GCA GAG CCG CTC CAG GCA AGA GCT CAT GAG ATG CCA GCC CAG AAG CAG			153
Ala Glu Pro Leu Gln Ala Arg Ala His Glu Met Pro Ala Gln Lys Gln			
20	25	30	
CCT CCA GCA GAT GAC CAG GAT GTG GTC ATT TAC TTT TCA GGA GAT GAC			201
Pro Pro Ala Asp Asp Gln Asp Val Val Ile Tyr Phe Ser Gly Asp Asp			
35	40	45	50
AGC TGC TCT CTT CAG GTT CCA GGC TCA ACA AAG GGC TTG ATC TGC CAT			249
Ser Cys Ser Leu Gln Val Pro Gly Ser Thr Lys Gly Leu Ile Cys His			
55	60	65	
TGC AGA GTA CTA TAC TGC ATT TTT GGA GAA CAT CTT GGT GGG ACC TGC			297
Cys Arg Val Leu Tyr Cys Ile Phe Gly Glu His Leu Gly Gly Thr Cys			
70	75	80	
TTC ATC CTT GGT GAA CGC TAC CCA ATC TGC TGC TAC TAA GCTTGCAGAC			346
Phe Ile Leu Gly Glu Arg Tyr Pro Ile Cys Cys Tyr			
85	90	95	
TAGAGAAAAA GAGTTCATAA TTTTCTTTGA GCATTAAGG GAATTGTTAT TCTTATAACCT			406
TGTCTCGAT TTCCCTGTCCT CATCCCAAAT AAATACTTGG TAACATG			453

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 94 ACIDES AMINES
- (B) TYPE: ACIDE AMINE
- (C) NOMBRE DE BRINS: SIMPLE
- (D) CONFIGURATION: LINEAIRE

## (ii) TYPE DE MOLECULE: PROTEINE

## (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Homo sapiens

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: PEPTIDE SIGNAL
- (B) EMPLACEMENT: 1..19

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: REGION PRO
- (B) EMPLACEMENT: 20..63

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: PEPTIDE MATURE
- (B) EMPLACEMENT: 64..94

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 3:

Met Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Ala Phe Leu Leu Val Ala Leu Gln  
1 5 10 15

Ala Trp Ala Glu Pro Leu Gln Ala Arg Ala His Glu Met Pro Ala Gln  
20 25 30

Lys Gln Pro Pro Ala Asp Asp Gln Asp Val Val Ile Tyr Phe Ser Gly  
35 40 45

Asp Asp Ser Cys Ser Leu Gln Val Pro Gly Ser Thr Lys Gly Leu Ile  
50 55 60

Cys His Cys Arg Val Leu Tyr Cys Ile Phe Gly Glu His Leu Gly Gly  
65 70 75 80

Thr Cys Phe Ile Leu Gly Glu Arg Tyr Pro Ile Cys Cys Tyr  
85 90

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 19 ACIDES AMINES
- (B) TYPE: ACIDE AMINE
- (C) NOMBRE DE BRINS: SIMPLE
- (D) CONFIGURATION: LINEAIRE

## (ii) TYPE DE MOLECULE: PEPTIDE SIGNAL

## (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Homo sapiens

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 4:

Met Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Ala Phe Leu Leu Val Ala Leu Gln  
1 5 10 15

Ala Trp Ala

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 44 ACIDES AMINES
- (B) TYPE: ACIDE AMINE
- (C) NOMBRE DE BRINS: SIMPLE
- (D) CONFIGURATION: LINEAIRE

## (ii) TYPE DE MOLECULE: REGION PRO

## (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Homo sapiens

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 5:

Glu Pro Leu Gln Ala Arg Ala His Glu Met Pro Ala Gln Lys Gln Pro  
1 5 10 15

Pro Ala Asp Asp Gln Asp Val Val Ile Tyr Phe Ser Gly Asp Asp Ser  
20 25 30

Cys Ser Leu Gln Val Pro Gly Ser Thr Lys Gly Leu  
35 40

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 31 ACIDES AMINES  
(B) TYPE: ACIDE AMINE  
(C) NOMBRE DE BRINS: SIMPLE  
(D) CONFIGURATION: LINEAIRE

(ii) TYPE DE MOLECULE: PEPTIDE MATURE

(vi) ORIGINE:  
(A) ORGANISME: Homo sapiens

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 6:

Ile	Cys	His	Cys	Arg	Val	Leu	Tyr	Cys	Ile	Phe	Gly	Glu	His	Leu	Gly
1					5				10					15	
Gly	Thr	Cys	Phe	Ile	Leu	Gly	Glu	Arg	Tyr	Pro	Ile	Cys	Cys	Tyr	
				20					25				30		

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte onal Application No

PCT/FR 98/01864

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

IPC 6 C07K14/47 C12N15/12 C12N15/63 C07K16/18 A61K38/17  
G01N33/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WILDE C G ET AL: "PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF HUMAN NEUTROPHIL PEPTIDE 4, A NOVEL MEMBER OF THE DEFENSIN FAMILY" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 264, no. 19, 5 July 1989, pages 11200-11203, XP000027256 see the whole document</p> <p>---</p>	1, 2, 4, 6-18
X	<p>US 5 641 497 A (BEVINS CHARLES L ET AL) 24 June 1997.</p> <p>see the whole document</p> <p>---</p>	1, 2, 4, 6-18, 20, 23-27, 31-37

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 November 1998

Date of mailing of the international search report

07/12/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Panzica, G

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte ~~nter~~ nal Application No

PCT/FR 98/01864

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 242 902 A (MURPHY CHRISTOPHER J ET AL) 7 September 1993  see column 1, line 1 - column 3, line 18 see table 1 see column 6, line 54 - column 8, line 40 ---	1, 4, 6-18, 21-27
X	WO 89 11291 A (INVITRON CORP) 30 November 1989  see abstract see page 1, line 5 - page 4, line 27 see page 7, line 1 - page 12, line 18 ---	1, 4, 6-18, 21, 23-26
A	WO 94 21672 A (UNIV CALIFORNIA) 29 September 1994 see abstract ---	1-18
A	WO 95 32287 A (MAGAININ PHARMA) 30 November 1995  see abstract see page 2 - page 18 ----	1, 4, - 6-18, 23-28

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/01864

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 5641497	A 24-06-1997	AU 4381493	A	30-12-1993
		CA 2135194	A	09-12-1993
		EP 0650494	A	03-05-1995
		JP 7507213	T	10-08-1995
		WO 9324513	A	09-12-1993
US 5242902	A 07-09-1993	NONE		
WO 8911291	A 30-11-1989	US 5032574	A	16-07-1991
		AT 108662	T	15-08-1994
		AU 633832	B	11-02-1993
		AU 3778289	A	12-12-1989
		DE 68916932	D	25-08-1994
		DE 68916932	T	03-11-1994
		EP 0378641	A	25-07-1990
		JP 2504396	T	13-12-1990
		JP 2795286	B	10-09-1998
		US 5210027	A	11-05-1993
WO 9421672	A 29-09-1994	US 5459235	A	17-10-1995
		AU 679739	B	10-07-1997
		AU 6523994	A	11-10-1994
		CA 2155739	A	29-09-1994
		EP 0689550	A	03-01-1996
		JP 8508165	T	03-09-1996
		US 5821224	A	13-10-1998
WO 9532287	A 30-11-1995	US 5550109	A	27-08-1996
		AU 2654395	A	18-12-1995
		US 5656738	A	12-08-1997

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der 3 Internationale No

PCT/FR 98/01864

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
 C1B 6 C07K14/47 C12N15/12 C12N15/63 C07K16/18 A61K38/17  
 G01N33/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porte la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WILDE C G ET AL: "PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF HUMAN NEUTROPHIL PEPTIDE 4, A NOVEL MEMBER OF THE DEFENSIN FAMILY" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 264, no. 19, 5 juillet 1989, pages 11200-11203, XP000027256 voir le document en entier ---	1, 2, 4,- 6-18
X	US 5 641 497 A (BEVINS CHARLES L ET AL) 24 juin 1997 voir le document en entier ---	1, 2, 4, 6-18, 20, 23-27, 31-37 -/-

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant poser un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "3" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

11 novembre 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

07/12/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Europeen des Brevets, P B 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Panzica, G

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Dern. Internationale No  
PCT/FR 98/01864

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Categorie	Identification des documents cites, avec le cas echeant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visees
X	US 5 242 902 A (MURPHY CHRISTOPHER J ET AL) 7 septembre 1993  voir colonne 1, ligne 1 - colonne 3, ligne 18 voir tableau 1 voir colonne 6, ligne 54 - colonne 8, ligne 40 ---	1,4, 6-18, 21-27
X	WO 89 11291 A (INVITRON CORP) 30 novembre 1989  voir abrégé voir page 1, ligne 5 - page 4, ligne 27 voir page 7, ligne 1 - page 12, ligne 18 ---	1,4, 6-18, 21, 23-26
A	WO 94 21672 A (UNIV CALIFORNIA) 29 septembre 1994 voir abrégé ---	1-18
A	WO 95 32287 A (MAGAININ PHARMA) 30 novembre 1995  voir abrégé voir page 2 - page 18 ----	1,4, 6-18, 23-28

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Bericht über die Internationale Nr.

PCT/FR 98/01864

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)			Date de publication
US 5641497	A	24-06-1997	AU	4381493	A	30-12-1993
			CA	2135194	A	09-12-1993
			EP	0650494	A	03-05-1995
			JP	7507213	T	10-08-1995
			WO	9324513	A	09-12-1993
US 5242902	A	07-09-1993	AUCUN			
WO 8911291	A	30-11-1989	US	5032574	A	16-07-1991
			AT	108662	T	15-08-1994
			AU	633832	B	11-02-1993
			AU	3778289	A	12-12-1989
			DE	68916932	D	25-08-1994
			DE	68916932	T	03-11-1994
			EP	0378641	A	25-07-1990
			JP	2504396	T	13-12-1990
			JP	2795286	B	10-09-1998
			US	5210027	A	11-05-1993
WO 9421672	A	29-09-1994	US	5459235	A	17-10-1995
			AU	679739	B	10-07-1997
			AU	6523994	A	11-10-1994
			CA	2155739	A	29-09-1994
			EP	0689550	A	03-01-1996
			JP	8508165	T	03-09-1996
			US	5821224	A	13-10-1998
WO 9532287	A	30-11-1995	US	5550109	A	27-08-1996
			AU	2654395	A	18-12-1995
			US	5656738	A	12-08-1997